

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 2 月 22 日 (22.02.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/12807 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12, 5/06, C07K 14/47 (OHTA, Shigeo) [JP/JP]; 〒194-0032 東京都町田市本町田1754-35 Tokyo (JP). 麻生定光 (ASOH, Sadamitsu) [JP/JP]; 〒211-0958 神奈川県川崎市幸区鹿島田224番地 Kanagawa (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/05502
- (22) 国際出願日: 2000 年 8 月 17 日 (17.08.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/230642 1999 年 8 月 17 日 (17.08.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 弁理士 西澤利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 太田成男

(54) Title: MODIFIED cDNA OF RAT bcl-x GENE AND MODIFIED PROTEIN

(54) 発明の名称: ラットbcl-x遺伝子の改変型cDNAと改変型タンパク質

(57) Abstract: A modified cDNA of rat bcl-xL gene characterized by having at least one base substitution from among, in the cDNA sequence of rat bcl-xL gene represented by SEQ ID NO:1, the substitution of Tyr at the 22-position in the coding domain by Phe, the substitution of Gln at the 26-position by Asn and the substitution of Arg at the 165-position by Lys; a recombinant vector carrying this modified cDNA; a transformed cell having this recombinant vector transferred thereto; and a modified protein Bcl-xL produced by this transformed cell. This modified Bcl-xL protein effectively inhibits cell death such as apoptosis, which makes it useful as, for example, an ingredient for remedies for various diseases in association with cell death.

(57) 要約:

この出願は、配列番号1に塩基配列を示したラット bcl-xL 遺伝子 cDNA 配列において、コード領域の第22番目 Tyr を Phe に変換する塩基置換、第26番目 Gln を Asn に変換する塩基置換および165番目 Arg を Lys に変換する塩基置換のうち、少なくとも一つの塩基置換を有することを特徴とするラット bcl-xL 遺伝子の改変型 cDNA、こ

の改変型 cDNA を含有する細胞、この改変型 cDNA を含有する細胞から生成する改変型タンパク質、この改変型タンパク質は、アポトーシス等の細胞死を効果的に抑制するため、細胞死を伴う各種疾患の治療薬剤成分等として有用である。



WO 01/12807 A1



明細書

ラット bcl-x 遺伝子の改変型 cDNA と改変型タンパク質

5 技術分野

この出願の発明は、ラット bcl-x 遺伝子の改変型 cDNA と改変型タンパク質に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、ラットのアポトーシス抑制遺伝子 bcl-x が発現するタンパク質 Bcl-xL よりもさらに高いアポトーシス抑制活性、細胞死抑制活性を有する改変型タンパク質 Bcl-xL を発現する新規な cDNA と、この cDNA の遺伝子工学的利用のための材料、さらにはこの cDNA が発現する改変型タンパク質 Bcl-xL に関するものである。

背景技術

アポトーシス (apoptosis) は、プログラムされた細胞死の一種であり、周囲の細胞との接触の欠乏、細胞質の濃縮化、エンドヌクレアーゼの活性に関連したクロマチンの凝縮および核凝縮、核の断片化、膜被包性球状小体化、隣接するマクロファージもしくは上皮細胞などによる球状小体の貪食、またはエンドヌクレアーゼ活性により DNA のヌクレオソーム単位が 180~200 塩基長の DNA に断片化するといった現象が観察され、このような現象が認められるアポトーシス小体の最終断片が隣接する細胞により貪食される機構として論じられている (例えば、Immunology Today 7:115-119, 1986 ; Science 245:301-305, 1989)。

このアポトーシスを制御する遺伝子としては、例えば、ヒト濾胞性 B 細胞腫から発見されたガン遺伝子のひとつである bcl-2 遺伝子 (Science 226(4678):1097-1099, 1984; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81(22):7166-7170, 1984) が知られており、その遺伝子構造や転写産物の解析あるいは cDNA クローンが報告されている (Pro

は、この遺伝子が発現する細胞は、高頻度で発現する。この遺伝子が発現産物はこれら細胞のアポトーシスを抑制することによって、ヒトの免疫機能や神経系機

能の恒常性を維持していると考えられている。また、この bcl-2 遺伝子は、胎児では特に広範囲には発現していることから、個体発生の際の形態形成にも重要な役割を果たしていると考えられてもいる。

その後、このヒト bcl-2 遺伝子のホモログがウシ、ラット、ニワトリ等で見いださ
5 れ、bcl-2 ファミリーと総称されている。

この出願の発明者らも、bcl-2 ファミリーに属するヒト bcl-x 遺伝子 (Cell 74(4):597-608, 1993) のホモログとしてラット bcl-x 遺伝子をクローニングし (J. Biol. Chem. 271(22):13258-13265, 1996)、またこのラット bcl-x 遺伝子が発現するタンパク質 Bcl-xL の立体構造を X 線解析により決定している (J. Biol. Chem. 272(44):27886-27892, 1997)。

この出願の発明者らは、ラット Bcl-xL のアポトーシス抑制効果をさらに増強することを目的として、その立体構造を変化させうるアミノ酸置換について検討した結果、特定のアミノ酸を他のアミノ酸に置換するように bcl-x 遺伝子の cDNA を改変させ、この改変型 cDNA を細胞内で発現させると、細胞アポトーシスを含む細胞死が15 顕著に抑制されることを見出した。

この出願の発明は、発明者らによるこのような新規な知見に基づいてなされたものであり、この新規な改変型ラット Bcl-xL タンパク質を細胞内で発現することのできる改変型 cDNA を提供することを課題としている。

またこの出願は、この改変型 cDNA を保有する組換えベクターと、この組換えベクターによる形質転換細胞を提供することを課題としてもいる。

さらにこの出願は、前記改変型 cDNA が発現する改変型タンパク質を提供することを課題としている。

25

発明の開示

この出願は、前記の課題を解決するため、次の(1)から(8)の発明を提供する。

(1) 配列番号 1 に塩基配列を示したラット bcl-x 遺伝子の cDNA 配列において、コード領域の第 22 番目 Tyr を Phe に変換する塩基置換、第 26 番目 Gln を Asn に変換する塩基置換および 165 番目 Arg を Lys に変換する塩基置換のうち、少なくとも一つの塩基置換を有することを特徴とするラット bcl-x 遺伝子の改変型 cDNA。

5

(2) 5'側に、細胞膜通過ペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを連結している前記発明(1)の改変型 cDNA。

(3) オリゴヌクレオチドが、配列番号 1 2 または 1 3 のアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドである前記発明(2)の改変型 cDNA。

10

(4) 前記発明(1)から(3)のいずれかの改変型 cDNA を保有する組換えベクター。

(5) 前記発明(4)の組換えベクターが導入された形質転換細胞。

15

(6) 前記発明(1)記載の改変型 cDNA が発現するタンパク質であって、配列番号 2 における第 22 番目 Tyr を Phe に変換するアミノ酸置換、第 26 番目 Gln を Asn に変換するアミノ酸置換、および 165 番目 Arg を Lys に変換するアミノ酸置換のうち、少なくとも一つのアミノ酸置換を有することを特徴とする改変型タンパク質。

20

(7) N末端側に細胞膜通過ペプチドを連結している前記発明(6)の改変型タンパク質。

(8) 細胞膜通過ペプチドが、配列番号 1 2 または配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有するオリゴペプチドである前記発明(7)の改変型タンパク質。

25

図 2 は、形質転換細胞における改変型 Bcl-xLFNK 発現量のウエスタンブロット解

図 2 は、形質転換細胞における改変型 Bcl-xLFNK 発現量のウエスタンブロット解

析の結果である。

図 3 は、血清除去によって誘導されるアポトーシスに対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

図 4 は、抗 Fas 抗体 (anti-Fas) に対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

5 図 5 は、スタウロスポリンに対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

図 6 は、TN-16 に対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

図 7 は、カンプトテシンに対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

図 8 は、ハイドロキシウレアに対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

図 9 は、トリコスタチン A に対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

10 図 10 は、過酸化水素に対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

図 11 は、パラコートに対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

図 12 は、熱に対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

図 13 は、熱処理後の形質転換細胞の脱水素酵素活性を調べた WST-1 Assay の結果である。

15 図 14 は、TN-16 処理後の形質転換細胞の脱水素酵素活性を調べた WST-1 Assay の結果である。

図 15 は、スタウロスポリン処理後の形質転換細胞の脱水素酵素活性を調べた WST-1 Assay の結果である。

20 図 16 は、サイトカイン IL-3 除去により誘導されるアポトーシスに対する形質転換細胞の抵抗性試験の結果である。

図 17 は、形質転換 CHO 細胞の無血清培地での増殖状態を示す顕微鏡写真である。

図 18 は、TAT-Bcl-xFNK タンパク質が HeLa 細胞中に取り込まれた状態を示す顕微鏡写真である。

25 図 19 は、TAT-Bcl-xFNK タンパク質を含む培地で 5 日間培養した軟骨組織培養細胞の顕微鏡写真である。

図 20 は、TAT-Bcl-xFNK タンパク質を含む培地で 9 日間培養した軟骨組織培養細胞の顕微鏡写真である。

図 21 は、Bcl-xFNK タンパク質を含む培地で 5 日間培養した軟骨組織培養細胞の

顕微鏡写真である。

図 2 2 は、Bcl-xFNK タンパク質を含む培地で 9 日間培養した軟骨組織培養細胞の顕微鏡写真である。

図 2 3 は、溶媒 (PBS) を含む培地で 5 日間培養した軟骨組織培養細胞の顕微鏡写真である。

図 2 4 は、溶媒 (PBS) を含む培地で 9 日間培養した軟骨組織培養細胞の顕微鏡写真である。

図 2 5 は、TAT-Bcl-xFNK タンパク質を全身性投与した後、デキサメタゾンを投与したマウスの肝臓切片の顕微鏡写真である。

10 図 2 6 は、溶媒 (PBS) を全身性投与した後、デキサメタゾンを投与したマウスの肝臓切片の顕微鏡写真である。

図 2 7 は、溶媒 (PBS) のみを全身性投与したマウスの肝臓切片の顕微鏡写真である。

15 発明を実施するための最良の形態

この出願の前記発明(1)の改変型 cDNA は、配列番号 1 に塩基配列を示したラット bcl-x 遺伝子の cDNA 配列において、第 22 番目の Tyr コドン (tac) を Phe コドン (ttt/ttc) に変換する塩基置換、第 26 番目 Gln (cag) を Asn コドン (aat/aac) に変換する塩基置換、165 番目 Arg コドン (cgg) を Lys コドン (aaa/aag) に変換する塩基置換のうち、少なくとも一つの塩基置換を有する cDNA である。そして、この発明(1)の改変型 cDNA においては、以上の 3 カ所全ての塩基置換を有することを好ましい態様としている。3 カ所の塩基置換を有する改変型 cDNA の場合、配列番号 3 にアミノ酸配列を示した改変型タンパク質 Bcl-xFNK を発現する。この改変型タンパク質 Bcl-xFNK は、図 1 に構造模式図を示した野生型ラット Bcl-xL における
25 第 22 番目 Tyr と第 156 番目 Asp、第 26 番目 Gln と第 164 番目 Ser、第 165 番目

この改変型 cDNA は、ラット bcl-x 遺伝子 cDNA を鋳型として、ミューテーション・キット等を使用する公知の方法や、あるいは後記の実施例に示した PCR 法などにより作成することができる。ラット bcl-x 遺伝子の cDNA はプラスミッド pEF1-BOSbcl-x (J. Biol. Chem. 271(22): 13258-13265, 1996) を使用することができる。

- 5 あるいはまた、配列番号 1 の任意部分の塩基配列に基づいてオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブとして用いてラット cDNA ライブラリーをスクリーニングする方法や、目的とする cDNA 断片の両末端にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーとして用いてラット細胞から単離した mRNA から RT-PCR 法により調製することもできる。

10

この出願の前記発明(2)および(3)は、前記発明(1)の改変型 cDNA の 5'側に細胞膜通過ペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを連結した DNA 断片（ポリヌクレオチド）であって、これらの DNA 断片は後述する改変型タンパク質 Bcl-xL を作成するために使用することができる。

15

- この出願の前記発明(4)の組換えベクターは、導入する細胞の種類（例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞や、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞、植物細胞等の真核細胞など）に応じて適宜な発現ベクターを選択し、これに発明(1)から(3)の改変型 cDNA を組み込むことによって作成することができる。例えば、大腸菌などの微生物
- 20 を対象とする場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター等を有する発現ベクターの DNA クローニング部位に前記(1)～(3)のいずれかの改変型 cDNA を組み込むことによって作成することができる。また、哺乳動物細胞等の真核細胞を対象とする場合には、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターを用いて発明(4)の
- 25 組換えベクターを作成することができる。

この出願の前記発明(5)の形質転換細胞は、発明(4)の組換えベクターが導入され、改変型タンパク質 Bcl-xL を発現する細胞である。細胞の種類は特に制限はなく、例

例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞や、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞、植物細胞等の真核細胞など前記(4)の組換えベクターによって形質転換可能な全ての細胞が含まれる。組換えベクターを細胞に導入するには公知の方法を用いることができる。例えば、哺乳動物細胞に組換えベクターを導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAE デキストラン法などを用いることができる。

なお、この発明(5)の形質転換細胞のうち、特に哺乳動物細胞は、後記の実施例にデータを示すように、無血清培地でも増殖可能である。すなわち、一般に培養細胞を一定の期間生存させるには、増殖因子を含む血清（ウシ胎児血清など）を培地に添加する必要がある。増殖因子によって細胞のアポトーシスが抑制され、生存期間を延長することができるからである。しかしながら、例えば生理活性物質やモノクローナル抗体などの細胞生成物を動物細胞から回収して精製する場合には、培地中に血清のような不純物が含まれていないことが望ましい。目的の物質を精製するための費用や工程が増加することや、血清中にウイルス等の危険因子が混入している危険性も存在するからである。そこで、培養液に血清を用いない無血清無蛋白培地が用いられてもいるが、実際には無血清無蛋白培地では細胞の増殖の程度は低く、死細胞も多い。そして、死細胞が多いと細胞の内容物が流出して培地を汚染するという問題も存在する。

一方、増殖因子を使用することなく細胞を増殖させる方法として、癌遺伝子の導入によって細胞を形質転換する方法も知られている。しかしながら、癌遺伝子産物が多量に発現すると、むしろアポトーシスが促進されることが明らかにされている。

発明(5)の形質転換哺乳動物細胞は、改変型タンパク質 Bcl-xL の発現によって、血清等の増殖因子が存在せずともアポトーシスを生じることなく、長期間にわたって培養することが可能である。また、このような優れた増殖能により、セルライン化が可能でもある。

発明(5)の改変型タンパク質 Bcl-xL は、発明(5)の改変型タンパク質が発現する。

質であり、配列番号 2 にアミノ酸配列を示した Bcl-xL における第 22 番目 Tyr を Phe

に変換するアミノ酸置換、第 26 番目 Gln を Asn に変換するアミノ酸置換、および 165 番目 Arg を Lys に変換するアミノ酸置換のうち、少なくとも一つのアミノ酸置換を有することを特徴としている。そして、これらのアミノ酸置換の全てを有する配列番号 3 のアミノ酸配列からなる Bcl-xFNK を最も好ましい態様としている。

5

この改変型タンパク質は発明(5)の形質転換細胞を培養し、その培養物から公知の分離操作を組み合わることによって単離精製することができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等である。

この改変型タンパク質は、例えば、アポトーシス抑制剤の有効成分またはそのリード化合物等として使用することができるが、さらには、この改変型 Bcl-xL の N 末端側に細胞膜通過ペプチドを連結させることが好ましい。この細胞膜通過ペプチドを備えることによって、改変型タンパク質 Bcl-xL は細胞膜を通過して細胞内に取り込まれ、細胞内において一過性にアポトーシスや細胞死を抑制する機能を発揮することができる。そして、このような細胞膜通過機能を有することによって、例えば以下の用途に使用することができる。

20

- (a) 組織移植において使用する細胞を長期間に渡って正常な状態に維持する。
- (b) 臓器移植において使用する臓器を長期間に渡って正常な状態に維持する。
- (c) 外科手術において、止血状態の臓器を安定に維持する。
- (d) 脳血栓等による脳虚血による細胞死の治療薬として使用する。
- 25 (e) 劇症肝炎の治療薬として使用する。
- (f) ステロイドホルモンの過剰投与による細胞死の防止薬として使用する。
- (g) 筋細胞の死等により筋萎縮を呈する疾患（例えば、筋ジストロフィー、筋無力症、筋症等）の治療薬として使用する。

(h) 外傷、火傷等による皮膚上皮細胞の細胞死の防止薬として使用する。

なお、細胞膜通過ペプチドとしては、配列番号 1 2 や配列番号 1 3 にアミノ酸配列を示したオリゴペプチドを使用することができる。配列番号 1 2 のオリゴペプチドは HIV-1・TAT の PTD (protein transduction domain) であり、配列番号 1 3 のオリゴペプチドはショウジョウバエのホメオボックスタンパク質アンテナペディアの PTD である。

これらの細胞膜通過ペプチドは、例えば HIV-1・TAT の場合にはそのアミノ酸配列およびその cDNA の塩基配列が公知であり (Science, 285:1569-1572, 1999; GenBank Accession NO. U39362 M96155)、その PTD に相当する領域 (HIV・TAT の 47~57 番アミノ酸配列) をコードする DNA 断片を前記発明(1)の改変型 cDNA と連結して融合 DNA 断片 (発明(3)) を作成し、この融合 DNA 断片を大腸菌等の宿主細胞で発現させることによって、N 末端側に PTD ペプチドを連結した改変型タンパク質 Bcl-xL を作成することができる。また、アンティペディアの PTD も公知であり (例えば、GenBank Accession No. AE001573)、同様にして PTD を融合した改変型タンパク質を作成することができる。あるいはまた、2 価の架橋剤 (例えば、EDC や β -アラニン等を介して、改変型 Bcl-xL と PTD ペプチドを結合させる方法によって細胞膜通過ペプチドを連結した改変型 Bcl-xL を作成することもできる。

20 実施例

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

実施例 1 : 改変型 cDNA の作成

25 ラット Bcl-xL の cDNA クローン pEF1-BOSbcl-x (J. Biol. Chem. 271:13258-13265,

... 最終的 ... 断片 ... 特定領域 ...
結合することにより、3 カ所のアミノ酸置換 (Tyr22Phe : Gln26Asn : Arg165Lys)

を導入した改変型 cDNA bcl-xFNK を作成した。

まず、Arg165Lys の置換導入した bcl-xR 165K を作製するために、2 つの DNA 断片 (A、B) を PCR 合成した。DNA 断片 (A) は、5'側プライマーとして配列番号 4 に示したプライマー 1 を、3'側プライマーとして配列番号 5 に示したプライマー 2 を用いた。プライマー 1 は、bcl-x cDNA の翻訳領域の上流で、ベクターの塩基配列を一部含む。また制限酵素 Bam HI 切断部位を含んでいる。プライマー 2 は、bcl-x cDNA のアンチセンス配列で、Arg165 のコドンに Lys をコードするように置換している。

DNA 断片 (B) は、5'側プライマーとして配列番号 6 に示したプライマー 3 を、3'側プライマーとして配列番号 7 に示したプライマー 4 を用いた。プライマー 3 は bcl-x cDNA のセンス配列で、Arg165 のコドンに Lys をコードするように塩基置換しており、5'側半分の塩基配列はプライマー 2 の 5'側半分の塩基配列と相補的である。プライマー 4 は bcl-x cDNA のアンチセンス配列で、その翻訳領域アミノ酸残基 178 から 184 に対応する。また、制限酵素 Bam HI の切断部位を含んでいる。

PCR 反応の詳細は以下のとおりである。

- ・ 反応溶液(溶液量 100 μ l) : 10 mM Tris-HCl, pH8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.001% gelatin, dATP, dCTP, dTTP, dGTP 各 0.2 mM
- ・ AmpliTaqGOLD : 2.5 U
- ・ 一对のプライマー : プライマー 1 とプライマー 2 の組み合わせ、プライマー 3 とプライマー 4 の組み合わせ (各プライマー 1 μ M)
- ・ テンプレート DNA : 50 ng
- ・ 反応条件 1 : 94°C/10 分 ; (94°C/30 秒 ; 53°C/30 秒 ; 72°C/1 分) \times 15

反応後、増幅された 2 つの DNA 断片 (A、B) はポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製した。次いで、上記 PCR 反応溶液 (25 μ l) に DNA 断片 A、B (それぞれ 6ng) を混合し、AmpliTaqGOLD を使って各々の相補鎖を合成した。合成条件は以下の反応条件 2 のとおりとした。

- ・ 反応条件 2 : 94°C/10 分 ; (94°C/30 秒 ; 41°C-47°C/30 秒 ; 72°C/1 分) \times 4

反応後、プライマー 1 とプライマー 4 (最終濃度各 1 μ M) と AmpliTaqGOLD

(2.5 U) を含む PCR 反応溶液 75 μ l を加え、前記の反応条件 1 により PCR を実行した。650 bp の PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製し、制限酵素 Bam HI で処理した。一方、pEF1-BOSbcl-x (2ヶ所の Bam HI 部位をもつ) を Bam HI で処理して2本の DNA 断片 (5650 bp と 650 bp) を調製し、長い DNA 断片
5 (5650 bp) に前記 PCR 産物を順方向に結合させ、Arg165Lys の変異を有するクローン pEF1-BOSbcl-xR 165K を得た。

bcl-x Y 22 F / Q 26 N は、先ず Gln26Asn のアミノ酸置換を導入し、次いで Tyr22Phe のアミノ酸置換を付加した。PCR は、pEF1-BOSbcl-x (50 ng) をテンプレートとして、前記プライマー 1 およびプライマー 5 (配列番号 8) の組み合わせ
10 と、前記プライマー 4 およびプライマー 6 (配列番号 9) の組み合わせでふたつの PCR を別々に行った。反応溶液 (100 μ l) の組成は前記と同様であり、反応条件は前記の条件 1 とした。なお、プライマー 5 は bcl-xcDNA のアンチセンス配列であり、Gln26 のコドン を Asn をコードするように塩基置換してある。また、プライマー 6
15 は bcl-xcDNA のセンス配列で、Gln26 のコドン を Asn をコードするように塩基置換しており、5'側半分の塩基配列はプライマー 5 の 5'側半分の塩基配列と相補的である。

PCR で増幅されたふたつの PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製し、2つの DNA 断片(それぞれ 6ng) を混合し、AmpliTaqGOLD を使って相補鎖を合成した。合成の条件は前記反応条件 2 と同一とした。
20 反応後、プライマー 1 とプライマー 4 (最終濃度各 1 μ M) と AmpliTaqGOLD (2.5 U) を含む PCR 反応溶液 (75 μ l) を加え、反応条件 1 により PCR を行った。650 bp の PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製し、制限酵素 Bam HI で処理した。一方、pEF1-BOSbcl-x を Bam HI で処理して2本の DNA 断片 (5650 bp と 650 bp) を調製し、長い DNA 断片 (5650 bp) に前記 PCR 産物を順方向に結合させ、Gln26Asn の変異を有するクローン pEF1-BOSbcl-xQ 26 N を得た。
25

配列番号 8 と組み合わせ、前記の反応条件 1 により PCR を行った。

ー 8 (配列番号 11) の組み合わせでふたつの PCR を別々に行った。反応溶液 (100

μl) の組成は前記と同様であり、反応条件は前記の条件 1 とした。なお、プライマー 7 は bcl-x cDNA のアンチセンス配列で、Tyr22 のコドンに Phe をコードするように塩基置換されている。また、プライマー 8 は bcl-x cDNA のセンス配列で、Tyr22 のコドンに Phe をコードするように塩基置換されており、5'側半分の塩基配列はプライマー 7 の 5'側半分の塩基配列と相補的である。

この PCR で増幅された 2 つの PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製し、2 つの DNA 断片(それぞれ 6ng) を混合し、AmpliTaQGold を使って相補鎖を合成した。合成条件は前記の反応条件 2 と同一とした。反応後、プライマー 1 とプライマー 4 (最終濃度各 1 μM) と AmpliTaQGold (2.5 U) を含む PCR 反応溶液 (75 μl)、前記の反応条件 1 により PCR を行った。

この PCR により得られた 650 bp の PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製し、制限酵素 Bam HI で処理した。一方、pEF1-BOSbcl-x を Bam HI で処理して 2 本の DNA 断片 (5650 bp と 650 bp) を調製し、長い DNA 断片 (5650 bp) に前記 PCR 産物を順方向に結合させ、Tyr22Phe および Gln26Asn の変異を有するクローン pEF1-BOSbcl-x Y 22 F / Q 26 N を得た。

最後に、pEF1-BOSbcl-x R 165 K と pEF1-BOSbcl-x Y 22 F / Q 26 N をそれぞれ 2 種類の制限酵素 (Bgl II と Kpn I) で切断し、pEF1-BOSbcl-x Y 22 F / Q 26 N 由来の約 1000 bp の Bgl II/Kpn I DNA 断片 (Tyr22Phe と Gln26Asn の変異を持つ) と、pEF1-BOSbcl-x R 165 K 由来の約 5300 bp の Bgl II/Kpn I DNA 断片 (Arg165Lys の変異を持つ) を結合させて改変型タンパク質 Bcl-xFNK をコードする改変型 cDNA の組換えベクター pEF1-BOSbcl-x Y 22 F / Q 26 N / R 165 K を得た。

実施例 2 : 形質転換細胞の作成

マウス前骨髄芽球細胞 FDC-P1 を、RPMI1640 培地に牛胎児血清(10%)とサイトカイン IL-3(WEHI 細胞培養液上清) を添加して培養した。ヒト白血病細胞 Jurkat 細胞は、RPMI1640 培地に牛胎児血清(10%)を添加して培養した。培養は CO₂ インキュベーター (5%CO₂/95%空気、37°C) で行った。

実施例 1 で作成した組換えベクター pEF1-BOSbcl-x Y 22 F / Q 26 N / R 165 K は大腸

菌 DH5 α MCR(GIBCO BRL 社) 内で増幅させ、Qiagen Plasmid midi Kit (Qiagen 社) で調製した。制限酵素 Sca I (切断部位は1つ) で切断し、開環して直鎖状になった DNA を 1 mM EDTA 溶液に溶かした。

増殖期の細胞 (FDC-P1,あるいは Jurkat)を氷冷 K-PBS 溶液 (30.8 mM NaCl, 5 120.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.46 mM KH₂PO₄)で 3 回洗浄し、5 mM MgCl₂ を含む K-PBS(Mg-K-PBS)に 10⁷細胞/ml になるように懸濁した。氷冷したキュベット (Electroporation Cuvettes Plus, 4 mm Gap, BTX, A Division of Genetronics)に細胞懸濁液 0.4 ml と Mg-K-PBS 溶液 0.4 ml を混合し、導入する直鎖状 pEF1-BOSbcl-xY22 F/Q26N/R165K (10 μ g) と薬剤 geneticin 耐性遺伝子を持つ直鎖状 DNA pST-neoB (0.5 μ g) を加えた。DNA 添加による体積の変化は 1%以下とした。10 分間 10 氷冷した後、Gene Pulser (BioRad 社) を用いて 250 μ F、330 V の条件でエレクトロポレーションを行い、組換えベクターを導入した。10 分間氷冷した後、100-mm ディッシュの中で 39 ml の培地に穏やかに懸濁し、CO₂ インキュベーターで培養した。1 日後、細胞を 96 穴プレートに分注した。FDC-P1 細胞では geneticin(GIBCO BRL) 15 を 200 μ g/ml 加え、また Jurkat 細胞では geneticin を 1 mg/ml 加え、geneticin 耐性細胞を選別した。

実施例 3 : 改変型 Bcl-xFNK 発現量の解析

実施例 2 で作成した形質転換細胞が発現している改変型 Bcl-xFNK の発現量をウェ 20 スタンブロットにより解析した。細胞を PBS(pH7.4; NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KCl 2.68 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM)で 1 回洗浄後、2%SDS (sodium dodecyl sulfate)水溶液を加え超音波によって全タンパク質を可溶化した。BCA Protein Assay (PIERCE 社) で蛋白質定量を行い、20 μ g のタンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (レムリの系) で分画した。泳動後、PVDF メンブレン (Amersham 25 Pharmacia Biotec 社)にブロッティングした。メンブレンを牛胎児血清 (10%) でブ

ロッキングした。その後、HRP 標識した二次抗体 (anti-mouse IgG, HRP 標識, Pierce & Warriner) を TBS (0.05% Tween80 0.2%)に浸け、37°C で 1 時間保温した。TBS で十分に洗浄したのち、HRP

(西洋ワサビペルオキシダーゼ)あるいはAP(アルカリフォスファターゼ)が結合した2次抗体を含むTBS溶液に浸けて37°Cで1時間保温した。HRPが結合した2次抗体ではRENAISSANCEキット(NEN Life Science Product社)を用いてX線フィルムに、APが結合した2次抗体ではATTOPHOSキット(ペーリンガー社)を用いてフルオロイメージアナライザーFLA-2000(Fujifilm社)でBcl-xLおよびBcl-xFNKを可視化して定量した。

結果は図2に示したとおりである。組換えベクターpEF1-BOSbcl-xFNKを導入した細胞は、野生型bcl-xLのクローンpEF1-BOSbcl-xLを導入した細胞と同一分子量(約30kDa)のタンパク質を発現していることが確認された。

10

実施例4：形質転換細胞Jurkatbcl-xFNKの細胞死に対する抵抗性の確認

実施例2で作成した形質転換細胞Jurkatbcl-xFNKについて、各種のアポトーシス誘因に対する抵抗性(非感受性)を試験した。結果は図3～図13に示す。これらの図において、白抜き丸印(○)は改変型Bcl-xFNKを発現しているトランスフェクタントJurkatbcl-xFNK、黒丸印(●)は同程度の蛋白量の正常Bcl-xLを発現しているトランスフェクタントJurkatbcl-x、白抜き四角印(□)はベクタープラスミッドDNAのみを導入したJurkatvec、白抜き菱印(◇)は遺伝子導入に用いた親株Jurkatを示す。

(a) 血清除去によって誘導されるアポトーシスに対する抵抗性

20 各細胞をPBSで3回洗浄した後、 1×10^5 個/mlになるように血清を含まない培地RPMI1640に懸濁した。CO₂インキュベーターで保温し、トリパンブルーで染色されない細胞(生細胞)の数を日をおって測定した。生細胞数が 5×10^5 /mlを超えないように注意し、超えそうな時は培地を2倍に希釈した。3日目ごとに血清を含まない培地の半分を新鮮なものと入れ替えた。

25 結果は図3に示したとおりであり、コントロールの親株やベクター導入細胞に比較して、野生型Bcl-xLを発現する形質転換細胞は血清除去に対して抵抗性を示し、長期間にわたって生存した。そして、改変型Bcl-xFNKを発現する形質転換細胞は、野生型Bcl-xL発現細胞よりもさらに長期間にわたって生存することから、その優れ

たアポトーシス抑制効果が確認された。また、この形質転換細胞は、無血清培地でも培養可能であることが確認された。

(b) 抗 Fas 抗体 (anti-Fas) に対する抵抗性

各細胞を 1×10^5 個/ml になるように培地 RPMI1640 に懸濁し、抗 Fas 抗体(クロー
5 ーン CH-11: MBL 社)を 1、10、100、1000 ng/ml の濃度で加えた。1 日培養した
のち、トリパンブルーで染色されない細胞(生細胞)の数を測定した。

結果は、抗 Fas 抗体未処理の生細胞数を 100%として図 4 に示した。この図 4 から明らかなように、改変型 Bcl-xFNK を発現する形質転換細胞は高濃度の抗 Fas 抗体に対して高い抵抗性を示した。

10 (c) 抗癌剤を含む各種の細胞毒性因子に対する抵抗性

各細胞を 1×10^5 個/ml になるように培地 RPMI1640 に懸濁し、スタウロスポリン (staurosporine : 20 nM)、TN-16 (10 μ M)、カンプトテシン (camptothecin : 10 μ M)、ヒドロキシウレア (hydroxyurea : 1 mM)、トリコスタチン A (trichostatin A : 0.25 μ g/ml)、過酸化水素 (hydrogen peroxide : 0.05 mM)、パラコート (paraquat : 1 mM) を加え、培養した。トリパンブルーで染色されない細胞 (生細胞) の数を日をおって測定した。

結果は図 5～11 に示したとおりであり、改変型 Bcl-xFNK を発現する形質転換細胞は、試験した全ての細胞毒性因子に対して高い抵抗性を示した。

(d) 熱に対する抵抗性

20 各細胞を 1×10^5 個/ml になるように培地 RPMI1640 に懸濁し、45°Cで 10 分間処理した。遠心して等量の新鮮な培地に細胞を懸濁し、37°Cで培養した。トリパンブルーで染色されない細胞（生細胞）の数を日をおって測定し、図 12 に示した。また、培養 1 日目で WST-1 を基質にした Cell Counting Kit(同仁化学)で細胞（培養液 100 μ l)が持つ脱酸素酵素の活性を調べ (WST-1 Assay)、加熱未処理の細胞が持つ酵素
25 活性を 100%として図 13 に示した。

ルで維持することが確認された。

実施例 5 : 形質転換細胞 FDC-P1bcl-xFNK の細胞死に対する抵抗性の確認

実施例 2 で作成した形質転換細胞 FDC-P1bcl-xFNK について、各種のアポトーシス誘因に対する抵抗性を試験した。結果は図 14~図 16 に示す。これらの図において、
5 白抜きの◇、□、△、▽、○は、クローン化された 5 種類のトランスフェクタント FDC-P1bcl-xFNK-1、-2、-3、-4、-5 を示す。また、●は、同程度の蛋白量の正常 Bcl-xL を発現しているトランスフェクタント FDC-P1bcl-x を、■はベクタープラスミッド DNA だけを導入した FDC-P1vec を示す。

(a) TN-16 とスタウロスポリン(staurosporine)に対する抵抗性

10 各細胞を 2×10^5 個/ml になるように培地に懸濁し、TN-16(50 μ M)とスタウロスポリン(10 nM)を加えて培養した。日をおって EST-1 を基質にした Cell Counting Kit (同仁化学) で細胞 (培養液 100 μ l) が持つ脱水素酵素の活性を調べた (WST-1 Assay)。酵素活性は薬剤を加える直前の活性を 100%とした。

結果は図 14 および 15 に示すとおりである。改変型 Bcl-xFNK を発現する形質転換
15 細胞のクローンはいずれも、TN-16 およびスタウロスポリン処理に対して、脱水素酵素活性を高いレベルで維持することが確認された。

(b) サイトカイン IL-3 除去により誘導されるアポトーシスに対する抵抗性

各細胞を 3 回 PBS で洗浄後、IL-3 を含まない培地 (血清は含む) に約 5×10^4 個/ml になるように懸濁し、トリパンブルーで生細胞数を測定した。日をおって同様に
20 生細胞数を測定し、IL-3 を除去した直後の生細胞数を 100%として図 16 に示した。
なお、FDC-P1vec を除いた他の細胞について 3 日目に IL-3 を含まない新鮮な培地で 5 倍希釈した。

図 16 から明らかなように、改変型 Bcl-xFNK を発現する形質転換細胞のクローンは
いずれも、IL-3 除去によって誘導されるアポトーシスに対して、野生型 Bcl-xL 発
25 現細胞よりも高い抵抗性を示し、IL-3 非存在下でも細胞が増殖することが確認され
た。

実施例 6 : 形質転換 CHO 細胞の作成

チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO を、実施例 1 で作成した組換えベクター組換えベクター pEF1-BOSbcl-xY 22 F/Q 26 N/R 165 K によって形質転換した。

- CHO 細胞 1×10^5 個を 10% 牛胎児血清を含む培養液 DMEM/F-12 (GIBCO BRL 社) に懸濁し、60-mm ディッシュで一晩培養した。SuperFect Transfection Reagent
- 5 キット (Qiagen 社) を用いて直鎖状 pEF1-BOSbcl-xY 22 F/Q 26 N/R 165 K (10μ g) と薬剤 Geneticin 耐性遺伝子を持つ直鎖状 pST-neoB (0.5μ g) を CHO 細胞にコトランスフェクションした。コントロールとして、直鎖状ベクター pEF1-BOS および直鎖状 pEF1-BOSbcl-x もそれぞれ直鎖状 pST-neoB とともに CHO 細胞に導入した。遺伝子導入処理後、10% 牛胎児血清を含む培養液 DMEM/F-12 で一晩培養した。
- 10 Geneticin (700μ g/ml) を加えて培養し、形質転換細胞を得た。それぞれの形質転換細胞について、実施例 3 と同様にして、改変型タンパク質 Bcl-xFNK と野生型 Bcl-xL を多量かつ同程度に発現している細胞を選択し、CHO bcl-x、CHO bcl-xFNK、およびベクターのみが導入された CHOvec を得た。

15 実施例 7 : 形質転換 CHO 細胞の無血清培地での培養

- 実施例 6 で作成した 3 種類の形質転換細胞 CHO bcl-xFNK、CHO bcl-x および CHOvec を 10% 牛胎児血清を含む培養液 DMEM/F-12 で培養した。増殖期の細胞 1×10^3 個を 100-mm ディッシュに植え継ぎ、3% 牛胎児血清を含む培養液 DMEM/F-12 で培養した。1 日ごとに培養液の 2/3 を牛胎児血清を含まない培養液 DMEM/F-12
- 20 で入れ替え、5 日目からは完全に牛胎児血清を含まない培養液 DMEM/F-12 で培養し、さらに 6 日間培養した。

- 結果は図 17 の写真に示したとおりである。改変型 Bcl-xFNK を発現する CHO bcl-xFNK (図 17C) は、ベクターのみを導入した CHOvec (図 17B) よりもはるかに良好に増殖した。また、Bcl-xL 発現細胞 (図 17A) に比べて死細胞が少なく、かつ細胞間の接触が維持されているコロニーを形成した。
- 25

実施例 8 : TAT-Bcl-xFNK タンパク質発現ベクターの構築

実施例 1 で作成された Bcl-xFNKcDNA をコードする改変型 cDNA に 2 段階 PCR 法で HIV ウィルスの TAT タンパク質の細胞膜通過ペプチド (PTD: Protein Transduction Domain) をコードする cDNA を融合させた。Bcl-xFNKcDNA をコードする組み換えベクター pEF1-BOSbcl-xY22F/Q26N/R165K を鋳型にして、5'側プライマーとしてプライマー 9 (配列番号 14) を、3'側プライマーとしてプライマー 10 (配列番号 15) を使用した。プライマー 9 は TAT-PTDcDNA の 3'端と Bcl-xFNKcDNA の開始コドンを含む 5'端のセンス配列を持っている。プライマー 10 は Bcl-xFNKcDNA の終始コドンを含む 3'端のアンチセンス配列で制限酵素 Hind III の切断部位を持っている。PCR 反応の詳細は以下のとおりである。

- ・ 反応溶液 (溶液量 100 μ l): 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.001% gelatin, dATP, dCTP, dTTP, dGTP 各 0.2 mM, AmpliTaqGOLD: 2.5 U
- ・ プライマー: プライマー 9 と プライマー 10 の組合せ (各 プライマー 1 μ M)
- ・ テンプレート DNA: 50 ng
- ・ 反応条件 3 ; 94°C/ 10 分; (94°C/ 30 秒 ; 49°C/ 30 秒; 72°C/ 1 分) \times 15

反応後、増幅された DNA 断片をポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製した。上記 PCR 反応液 (25 μ l) に精製された DNA 断片 (25 ng) と プライマー 11 (配列番号 16) を混合し、AmpliTaqGOLD を使って相補鎖の合成を行った。プライマー 16 は配列番号 12 に示された TAT-PTD のアミノ酸配列をはさんで、5'端に Met (開始コドン)-Gly を、3'端に Gly をコードし、さらに Bcl-xFNKcDNA の開始コドンを含む 5'端のセンス配列を含む。合成条件は以下のようにした。

- ・ 反応条件 4 ; 94°C/10 分 ; (94°C/30 秒 ; 53°C—59°C/30 秒 ; 72°C/1 分) \times 5

反応後、塩基配列プライマー 12 (配列番号 17) と プライマー 10 (最終濃度各 1 μ M) と AmpliTaqGOLD (2.5 U) を含む PCR 反応溶液 75 μ l を加え、前記の反応条件 3 により PCR を実行した。プライマー 12 は Met-Gly に続き TAT-PTD の N 末端の 3 個のアミノ酸を含むセンス配列で、5'端には制限酵素 Nde I の切断部位を持つ。増幅された DNA 断片をポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製した。Nde I で切断後、そ

の切断面を T4DNA ポリメラーゼで平滑化し、さらに Hind III で切断処理を行った。
大腸菌発現ベクター pROEX1 (Life Technologies 社) を Nco I で切断し、ヌクレアーゼ
S1 でその切断断面を平滑化した後、Hind III で切断処理をした。ふたつの DNA を結
合させて、TAT タンパク質の細胞膜通過ペプチドが N 末に融合した TAT-Bcl-xFNK
5 をコードする組換えベクター pROEX1-bcl-xY22F/Q26N/R165K を得た。

実施例 9 : TAT-Bcl-xFNK タンパク質の調製

TAT-Bcl-xFNK タンパク質は以下に示すように大腸菌内で発現させ、部分精製した。
すなわち、pROEX1-bcl-xY22F/Q26N/R165K を保持した大腸菌 DH5 α MCR 株をアン
10 ピシリン (50 μ g/ml) を含む LB 液体培地 1000 ml (酵母エキス 5 g, バクトトリプト
ン 10 g, NaCl 5 g) で振とう培養 (37°C) した。対数増殖期 (O.D.600=0.5) に達したとこ
ろで IPTG (イソプロピル-1-チオ- β -ガラクトシド; 最終濃度 1 mM) を加え、2 時間
培養を続けた。TAT-Bcl-xFNK タンパク質は細胞破壊後の可溶性画分と不溶性画分
(封入体) からそれぞれ調製した。可溶性画分からは次のように調製した。集菌後、
15 PBS で 3 回洗浄し緩衝液 A (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1
mM PMSF) 40 ml に懸濁し、大腸菌細胞を超音波破壊した。遠心後の上清から TAT-
Bcl-xFNK をラット Bcl-xL の N 末端領域を認識するマウス由来のモノクローナル抗体
35-32 を担体に結合させて充填したカラムを使った抗体アフィニティークロマトグラ
フィーで精製した。TAT-Bcl-xFNK を抗体に結合させて、洗浄した後、溶出液 (50
20 mM Glycine-HCl, pH 2.7, 50 mM NaCl) で TAT-Bcl-xFNK を溶出させた。2 M Tris-HCl
(pH 9.0) 溶液で中和した後、セントリコン (Amicon 社) で濃縮した。PBS で透析して、
タンパク質標品とした。不溶性画分 (封入体) からの調製は次のようにした。集菌後、
PBS で 3 回洗浄し、PMSF のかわりに DTT を含む緩衝液 A (50 mM Tris-HCl, pH 8.0,
150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT) 36 ml に懸濁し、超音波にて大腸菌細胞を
25 破壊した。トリトン X-100 (最終濃度 1 %) を加えて、10 分氷上に置いた。遠心にて

3 回緩衝液 A (封入体) を 3 回洗浄し、最後は封入体 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl) を含む PBS に可溶化した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にての純度 70% の

TAT-Bcl-xFNK タンパク質標品であることを確認し、以下の実験に用いた。

実施例 10 : TAT-Bcl-xFNK タンパク質の細胞内への取り込み

Slide Chamber (Lab-Tek 社)上で培養されている HeLa 細胞の培地 10%FBS (牛胎
5 児血清)を含む DMEM/F-12 (Life Technologies 社)に TAT-Bcl-xFNK タンパク質
(1 μ M)を加え、24 時間 CO₂ インキュベーター内で細胞を培養した。PBS で 2 回洗
浄した。細胞を PBS に溶かしたパラホルムアルデヒド(4%)で 45 分間、室温で固定
した。PBS で 3 回(5 分/回)洗浄し、10%FBS を含む PBS で 20 分ブロッキングした。
10 PBS で 3 回(5 分/回)洗浄し、ラット Bcl-xL に対するモノクローナル抗体 35-32 (マウ
ス由来)を含む 1.5%FBS-PBS 溶液で 30 分間細胞を処理した。PBS で 3 回(5 分/回)
洗浄し、FITC が結合している抗マウス IgG 抗体を含む 1.5%FBS-PBS 溶液で 30 分
間細胞を処理した。PBS で 3 回(5 分/回)洗浄した後、PBS 溶液で細胞を封入し、蛍光
顕微鏡で観察した。

結果は図 18 に示したとおりであり、細胞内に点状に FITC 特有の蛍光が認められ
15 た。この蛍光シグナルは TAT-Bcl-xFNK タンパク質未添加の細胞には認められず、
TAT-Bcl-xFNK 蛋白を加えても一次抗体 (35-32) で処理しない細胞には認められな
った。このことは、培地に加えられた TAT-Bcl-xFNK タンパク質が細胞質膜を通過
して細胞内に取り込まれたことを示している。

20 実施例 11 : TAT-Bcl-xFNK の軟骨組織培養細胞への導入と細胞死抑制効果の確認

変形性股関節症患者の骨頭置換手術で摘出された大腿骨頭から無菌的に片刃かみ
そりにて軟骨下骨の上にある軟骨組織をスライス状(10×10mm 厚さ 1-2mm)に切り取
った。24 穴プレート内に挿入し、20%FBS (ウシ胎児血清)を含む DMEM/Ham F-12
混合培地(Life Technologies 社)にて 37°C, CO₂ インキュベーター内で培養した。比
25 較検討のために TAT-Bcl-xFNK と同じ方法で、TAT-Bcl-xL の発現ベクターを作成し、
TAT-Bcl-xL タンパク質を大腸菌より部分精製した(タンパク質標品の純度は同じ)。
TAT-Bcl-xFNK(封入体より調製)と TAT-Bcl-xL(封入体より調製)をそれぞれを 0.2 μ M
となるように培地に添加した。コントロールとして、7 M Urea と 1 mM DTT を含む

PBS(タンパク質標品に用いた溶媒)を同量加えた。培地および添加したタンパク質標品は4日目と7日目に交換した。4日および9日間培養した軟骨組織を凍結し、順次クリオスタットにて薄切しヘマトキシリン・エオシン染色にて軟骨細胞死の評価を行った。結果は図19~24に示したように、TAT-Bcl-xFNKはTAT-Bcl-xLより軟骨細胞死を抑制し、その差は9日間培養の軟骨組織で顕著であった。培地中のTAT-Bcl-xFNKタンパク質が軟骨組織の中に埋もれている軟骨細胞に取り込まれてその強力な細胞死抑制活性が発揮されることが示された。

実施例 12 : TAT-Bcl-xFNK のマウスへの投与とステロイドホルモンによる肝臓細胞死抑制効果の確認

8週令のマウス(体重20gのC56BL種のメス)3匹を3群(A,B,C)に分けた。A群のマウスには100 μ gのTAT-Bcl-xFNKタンパク質(可溶性画分から調製)が溶けているPBS溶液(0.8ml)を腹腔内に投与した。B群とC群(コントロール)のマウスにはPBS溶液(0.8ml)を同じように腹腔内に投与した。ゲージに戻して3時間後にA群とB群のマウスにステロイドホルモン(デキサメタゾン)0.5mgが溶けている25%エタノール/PBS溶液0.5mlを腹腔内に投与した。C群のマウスには25%エタノール/PBS溶液0.5mlを腹腔内に投与した。ゲージに戻して3時間後に屠殺し、肝臓を摘出して凍結し、クリオスタットにて薄切しヘマトキシリン・エオシン染色にて実質細胞死を評価した。図26に示したようなB群におけるデキサメタゾンによる肝臓組織の変性と細胞死、TAT-Bcl-xFNKの前投与によって著しく抑制され(A群:図25)、その程度はコントロール(C群:図27)より良いことが確認された。

以上の結果は、腹腔内に投与されたTAT-Bcl-xFNKタンパク質が肝臓の実質細胞に取り込まれ、デキサメタゾンによる細胞死を強力に抑制していることを示すものである。

以上詳述した説明は、本発明の要旨を説明し、本発明の効果を説明するものである。本発明は、Bcl-xLタンパク質を発現することのできる改変型増強された改変型ラット Bcl-xL タンパク質を細胞内で発現することのできる改変型

- cDNA と、この改変型 cDNA を保有する組換えベクター、この組換えベクターによる形質転換細胞が提供される。この形質転換細胞は、無血清培地でも増殖可能であり、例えば、生理活性物質やモノクローナル抗体等の有用物質を効率よく生産するための細胞培養系等として有用である。さらに、この出願の発明によって細胞死抑制作用がさらに増強された改変型ラット Bcl-xL タンパク質が提供される。この改変型タンパク質は、細胞膜通過ペプチドを備えることによって、細胞内に取り込まれ、細胞内で一過性にアポトーシス・細胞死抑制作用を発揮するため、たとえば各種の細胞死による疾患の治療薬や、移植細胞・臓器等を安定に維持するための添加剤等の成分として有効である。

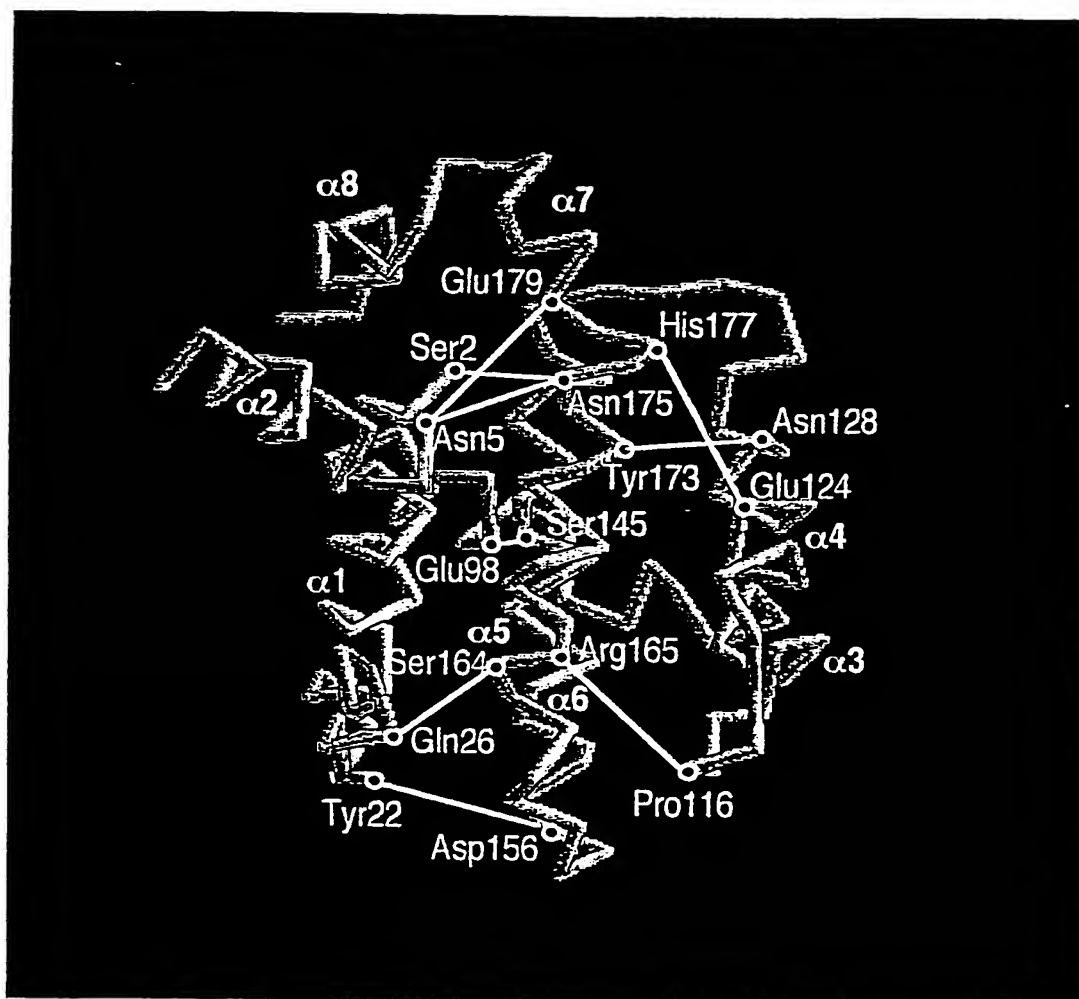
請求の範囲

1. 配列番号 1 に塩基配列を示したラット bcl-x 遺伝子の cDNA 配列において、コード領域の第 22 番目 Tyr を Phe に変換する塩基置換、第 26 番目 Gln を Asn に変換する塩基置換および 165 番目 Arg を Lys に変換する塩基置換のうち、少なくとも一つの塩基置換を有することを特徴とするラット bcl-x 遺伝子の改変型 cDNA。
5
2. 5'側に、細胞膜通過ペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを連結している請求項 1 の改変型 cDNA。
10
3. オリゴヌクレオチドが、配列番号 1 2 または 1 3 のアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドである請求項 2 の改変型 cDNA。
15
4. 請求項 1 から 3 のいずれかの改変型 cDNA を保有する組換えベクター。
15
5. 請求項 4 の組換えベクターが導入された形質転換細胞。
20
6. 請求項 1 記載の改変型 cDNA が発現するタンパク質であって、配列番号 2 における第 22 番目 Tyr を Phe に変換するアミノ酸置換、第 26 番目 Gln を Asn に変換するアミノ酸置換、および 165 番目 Arg を Lys に変換するアミノ酸置換のうち、少なくとも一つのアミノ酸置換を有することを特徴とする改変型タンパク質。
20
7. N 末端側に細胞膜通過ペプチドを連結している請求項 6 の改変型タンパク質。
25
8. 細胞膜通過ペプチドが、配列番号 1 2 または配列番号 1 3 のアミノ酸配列を



1/17

図 1





2/17

図 2

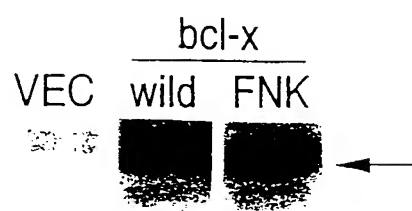
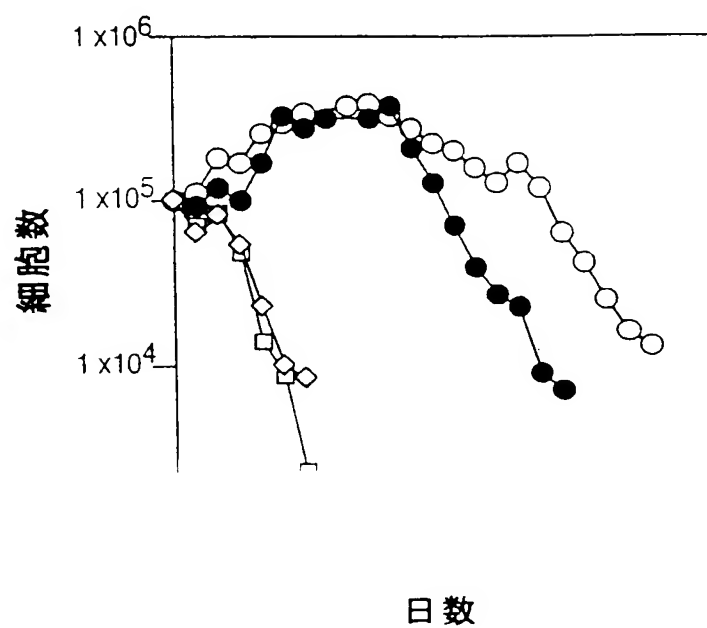


図 3



3/17

図 4

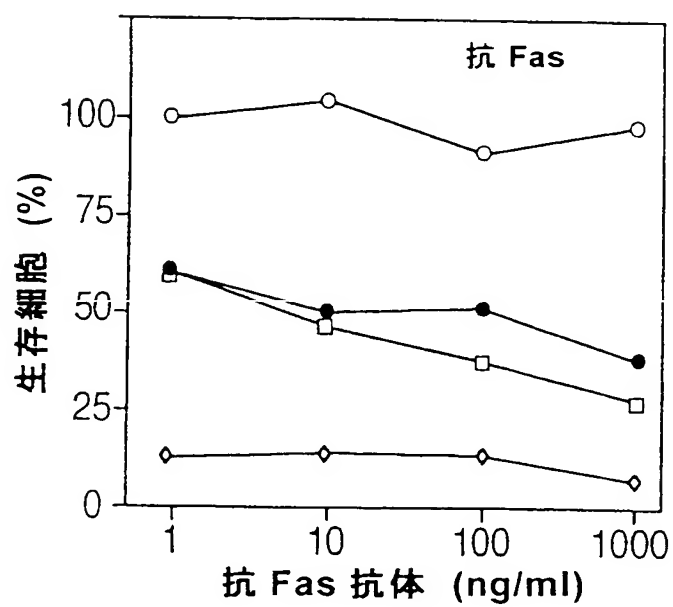
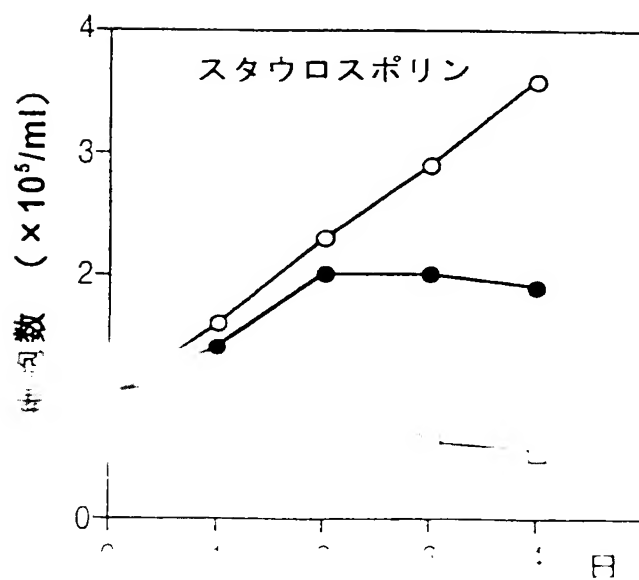


図 5





4/17

図 6

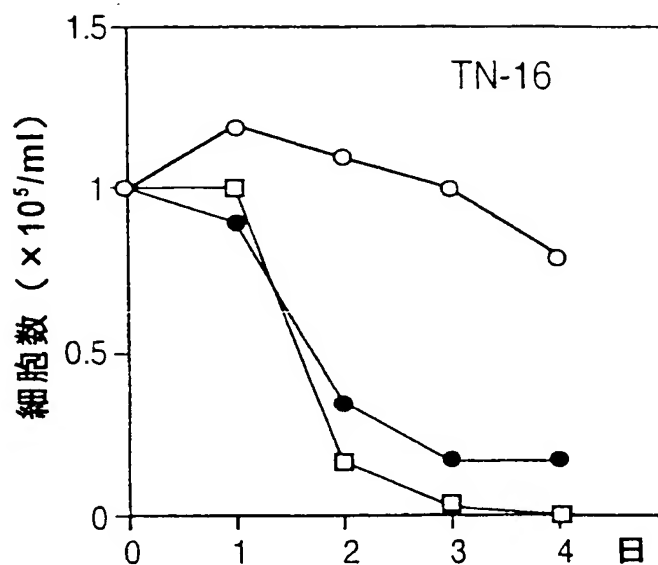
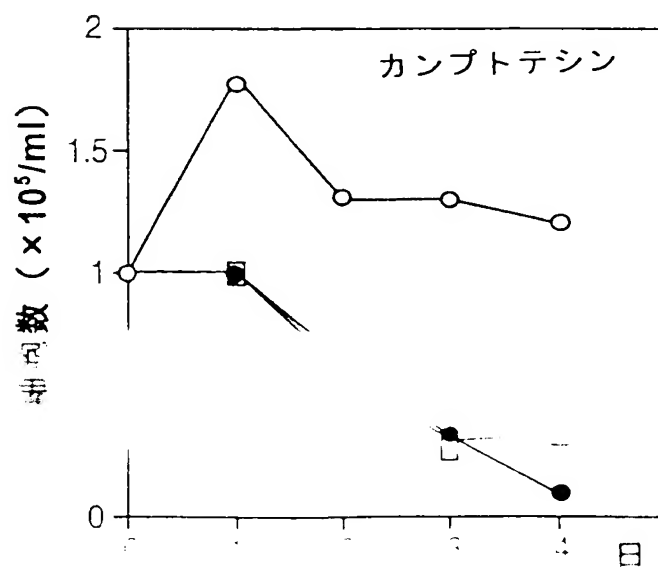


図 7





5/17

図 8

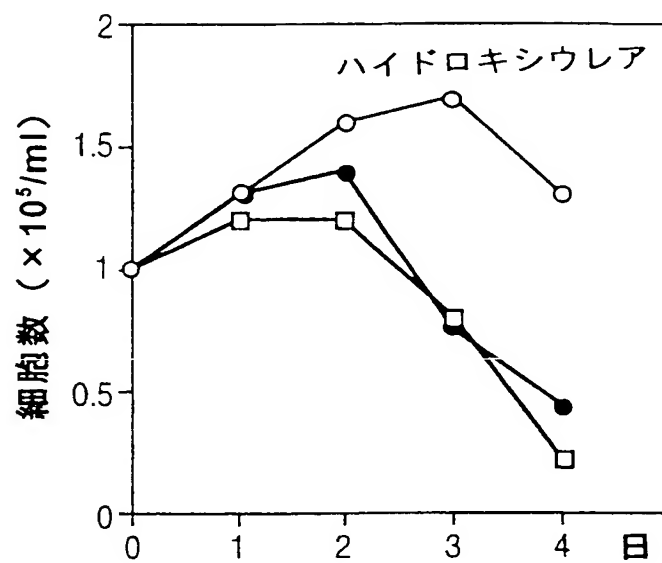
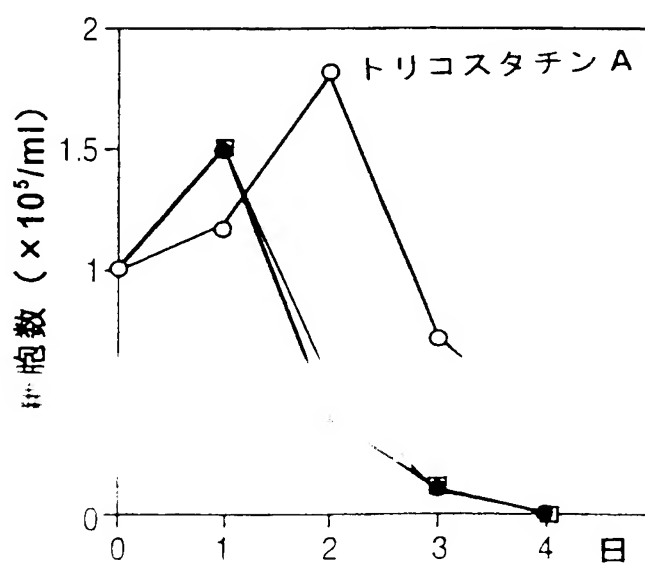


図 9





6/17

図 10

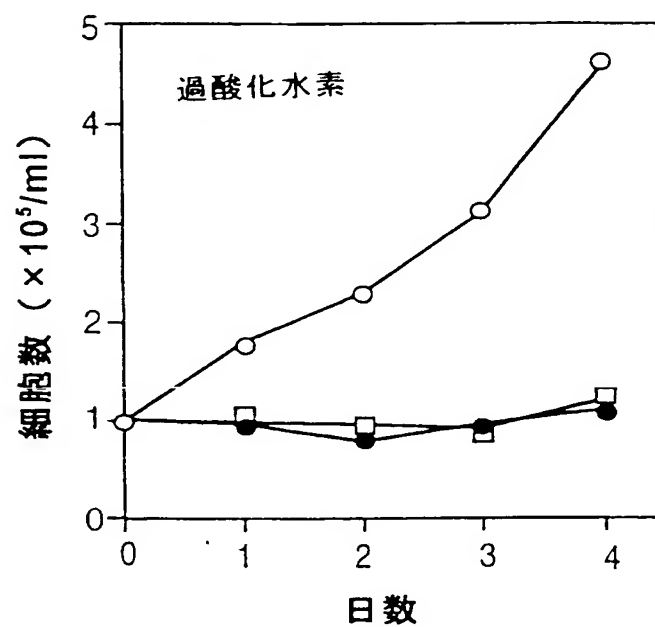
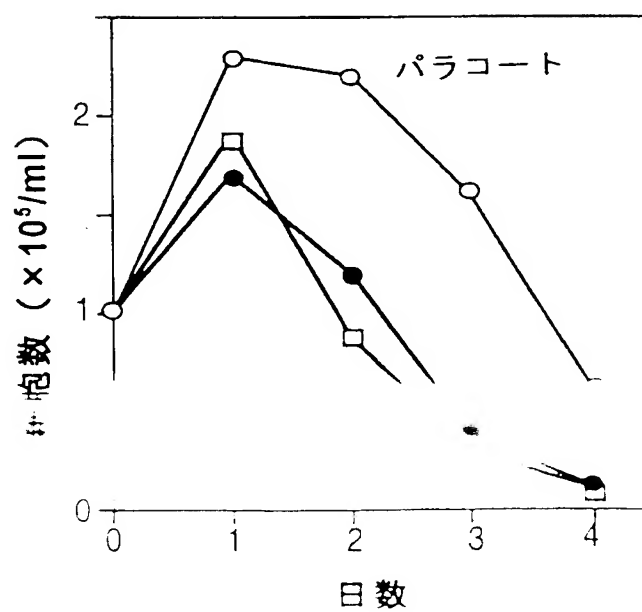


図 11





7/17

図 12

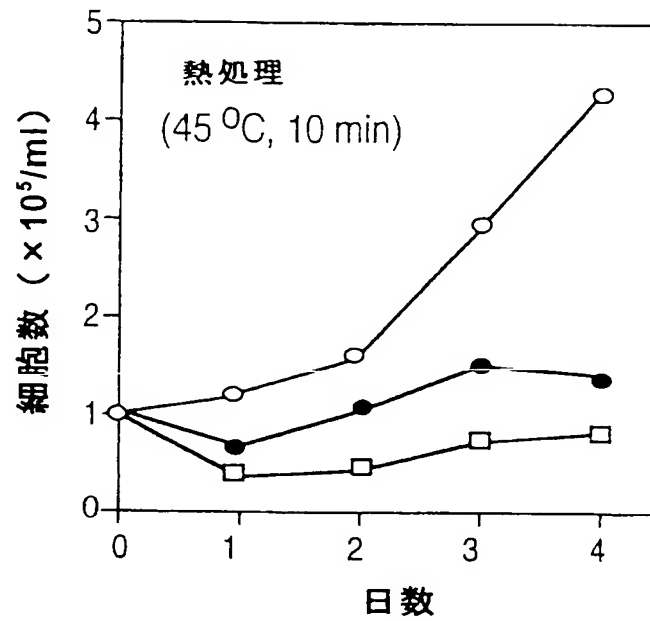
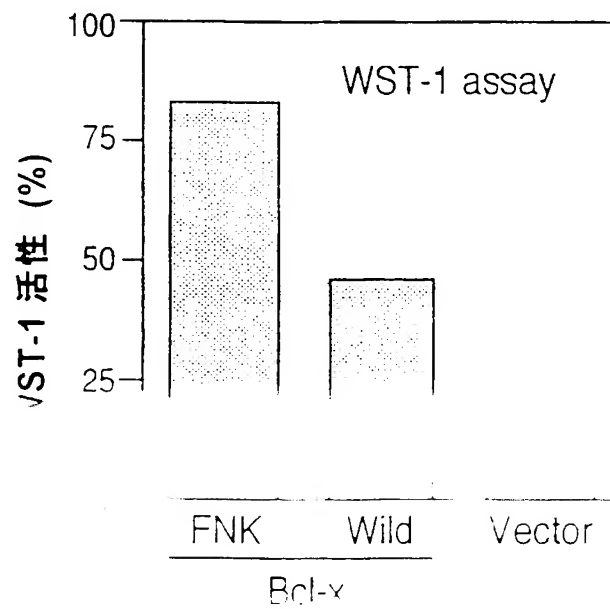


図 13





8/17

図 14

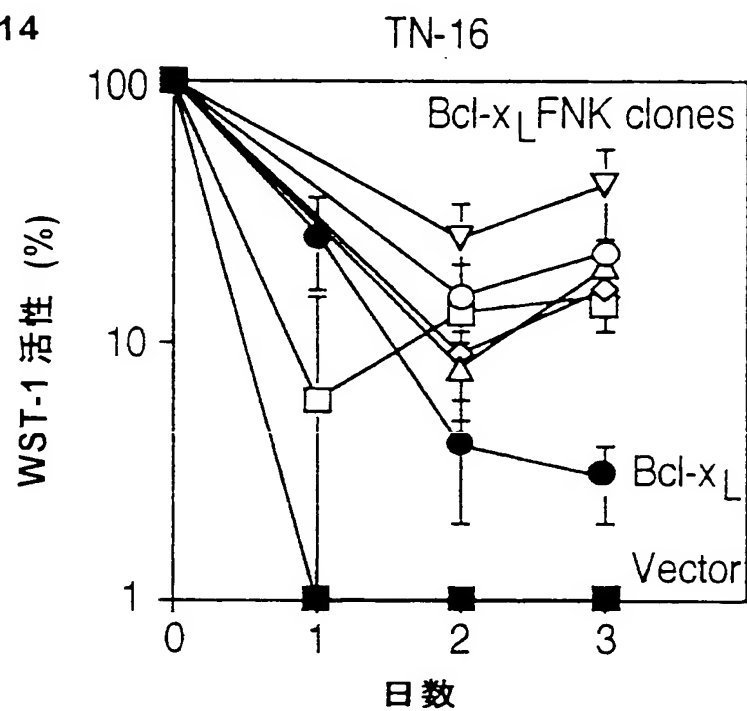
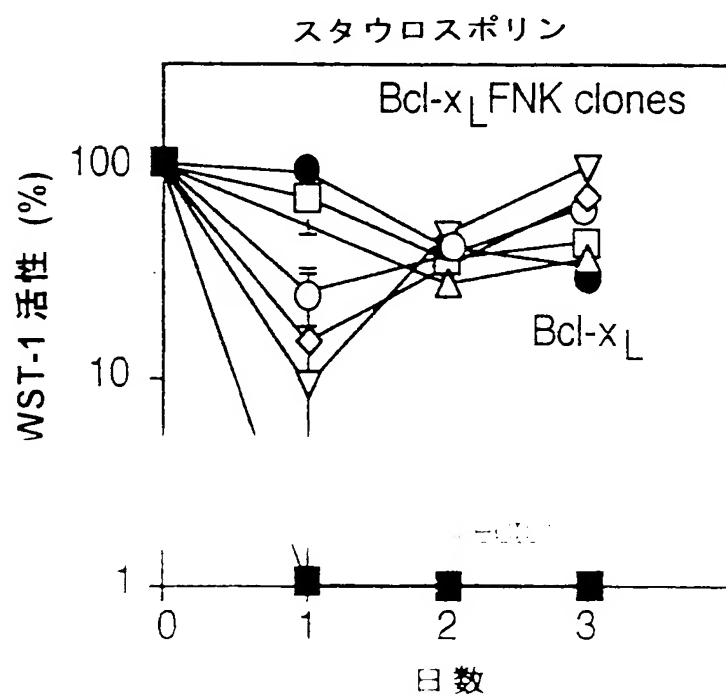


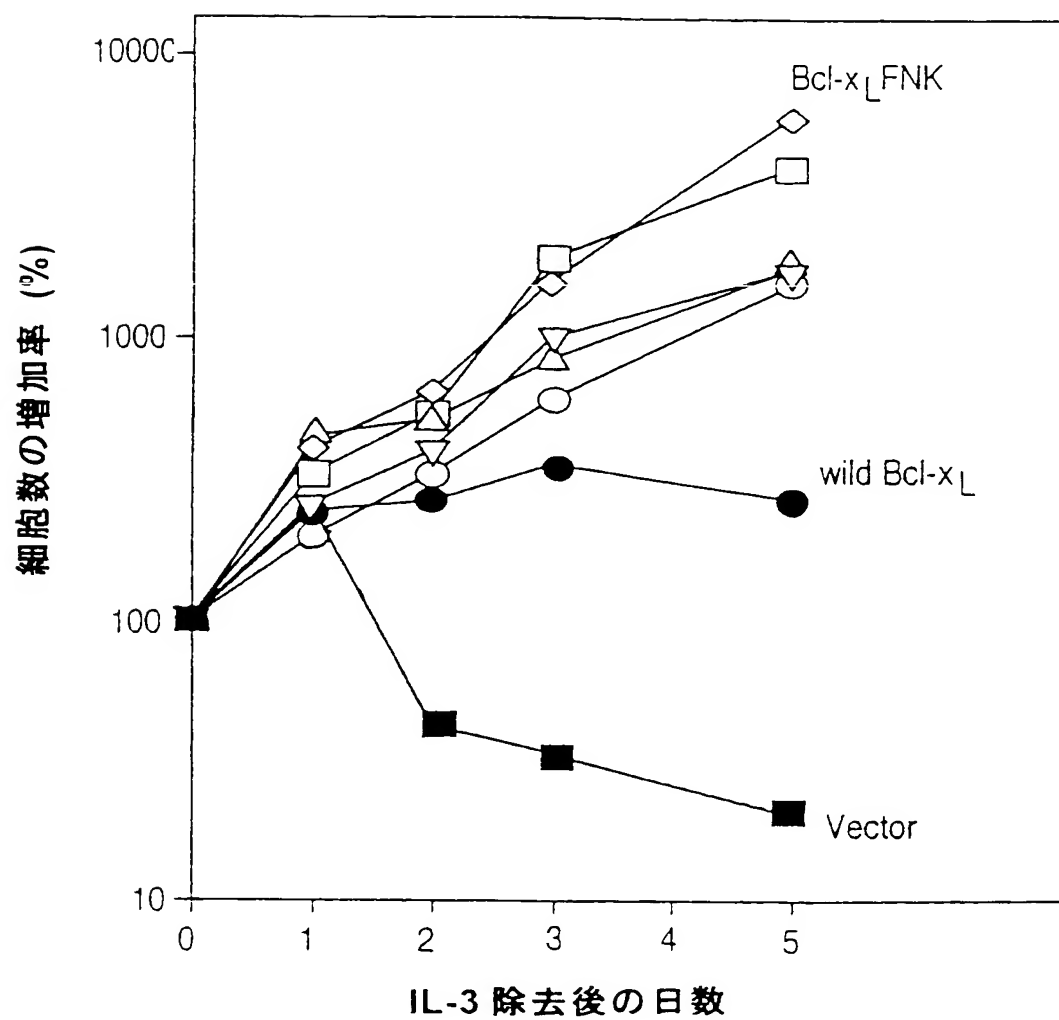
図 15





9/17

図 16





10/17

図 17

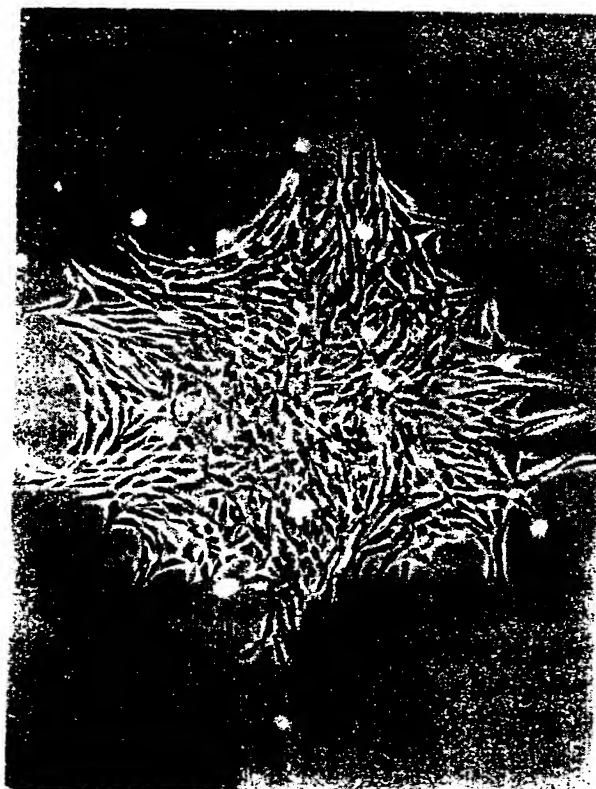
A



B



C





11/17

図 18





12/17

図 19

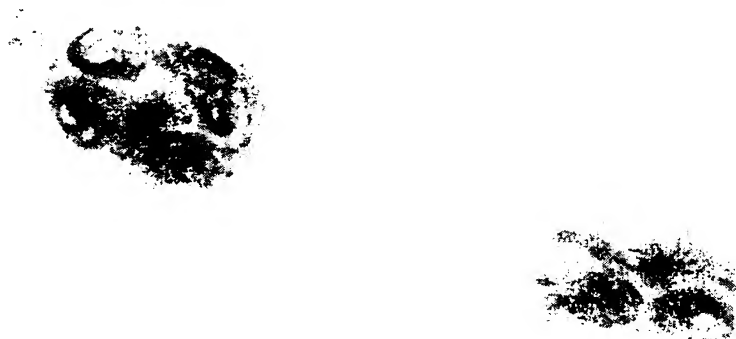
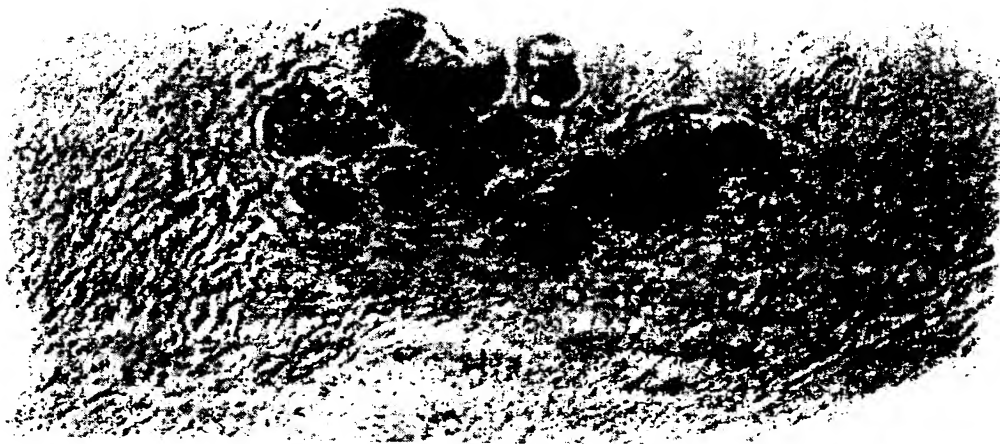


図 20





13/17

図 21

図 22



14/17

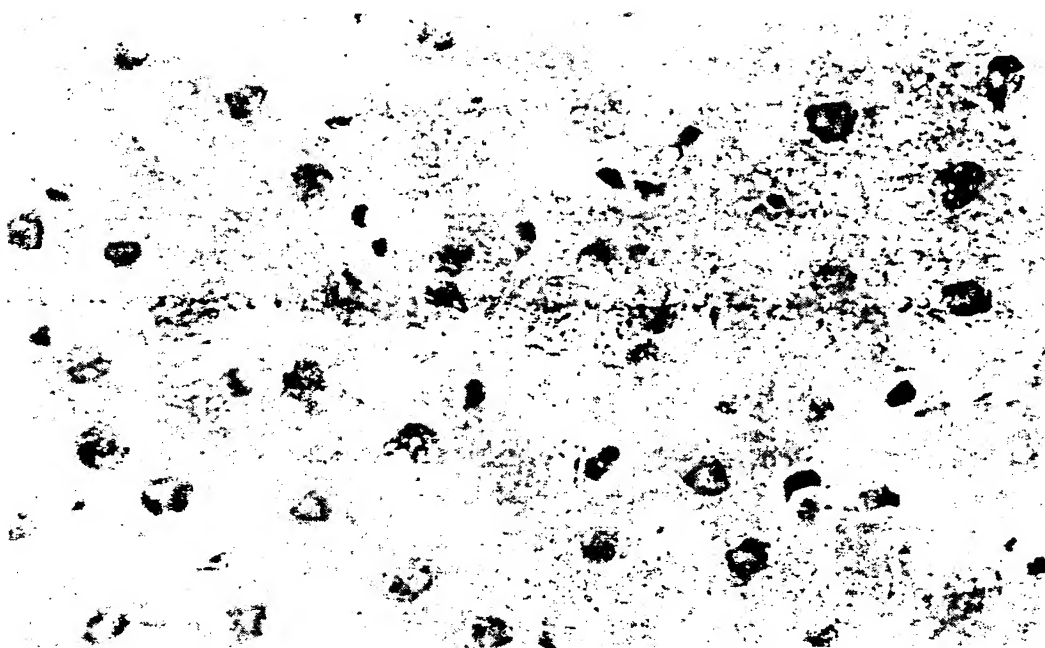
図 23

図 24



15/17

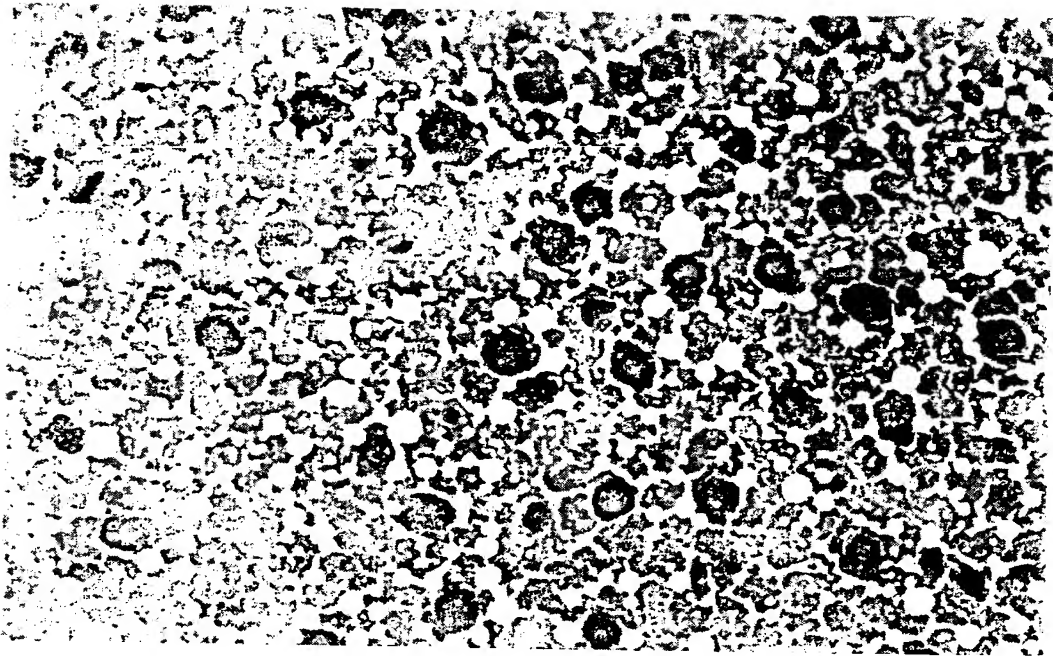
図 25





16/17

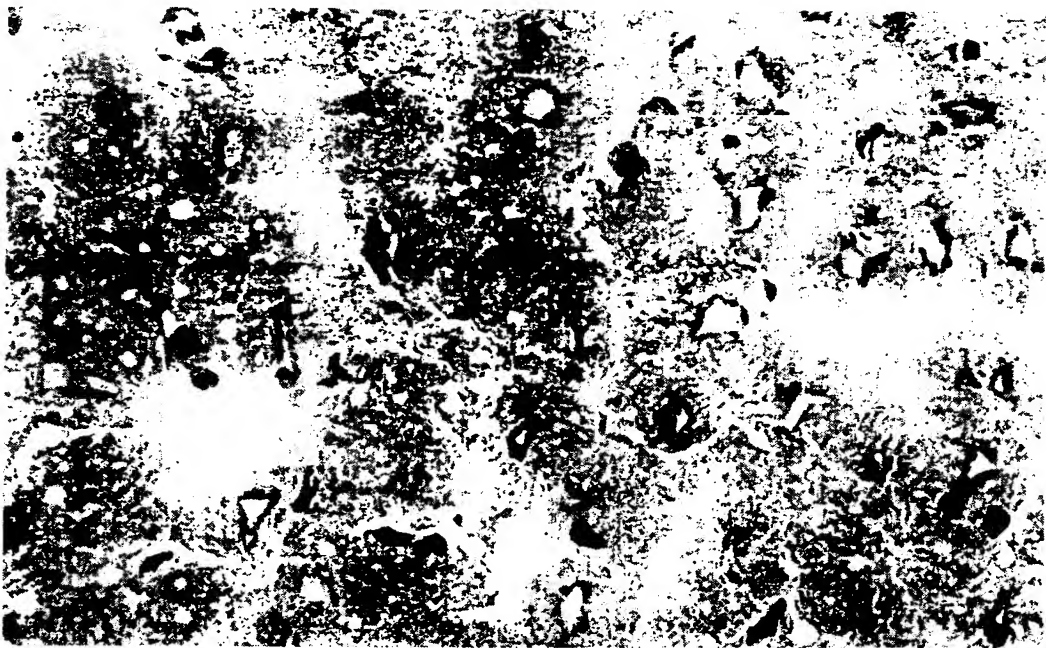
図 26





17/17

図 27





配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

5 <120> A mutagenized rat bcl-xL cDNA and a modified protein therefrom

<130> NP00291-YS

<150> JP11-230642

10 <151> 1999-08-17

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1742

15 <212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (72)..(773)

20 <300>

<302> An additional form of rat Bcl-x, Bcl-xbeta, generated
by an unspliced RNA, promotes apoptosis in promyeloid
cells.

<303> J. Biol. Chem.

25 <304> 271

<307> May 31, 1996



<400> 1

cacagagcag acccagtgag tgagcaggtg ttttggacaa tggactggtt gagcccatct 60
 ctattataaa a atg tct cag agc aac cgg gag ctg gtg gtt gac ttt ctc 110

Met Ser Gln Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Asp Phe Leu

5

1

5

10

tcc tac aag ctc tcc cag aaa gga tac agc tgg agt cag ttt agc gat 158
 Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser Trp Ser Gln Phe Ser Asp

15

20

25

gtc gaa gag aac agg act gaa gcc cca gaa gaa act gaa cca gaa agg 206
 10 Val Glu Glu Asn Arg Thr Glu Ala Pro Glu Glu Thr Glu Pro Glu Arg
 30 35 40 45

gag acc ccc agt gcc atc aat ggc aac cca tcc tgg cac ctg gcg gat 254
 Glu Thr Pro Ser Ala Ile Asn Gly Asn Pro Ser Trp His Leu Ala Asp

50

55

60

15 agc ccc gcg gtg aat gga gcc act ggc cac agc agc agt ttg gat gcg 302
 Ser Pro Ala Val Asn Gly Ala Thr Gly His Ser Ser Ser Leu Asp Ala

65

70

75

cgg gag gta atc ccc atg gca gca gtg aag caa gcg ctg aga gag gct 350
 Arg Glu Val Ile Pro Met Ala Ala Val Lys Gln Ala Leu Arg Glu Ala

20

80

85

90

ggc gat gag ttt gaa ctg cgg tac cgg aga gca ttc agt gat cta aca 398
 Gly Asp Glu Phe Glu Leu Arg Tyr Arg Arg Ala Phe Ser Asp Leu Thr

95

100

105

tcc cag ctt cat ata acc cca ggg aca gca tat cag agc ttt gaa cag 446

25

Ser Gln Leu His Ile Thr Pro Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Phe Glu Gln

Val Val Asn Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val



130 135 140
gcc ttc ttc tcc ttt ggc ggg gca ctg tgc gtg gaa agc gta gac aag 542
Ala Phe Phe Ser Phe Gly Gly Ala Leu Cys Val Glu Ser Val Asp Lys
145 150 155
5 gag atg cag gta ttg gtg agt cgg att gca agt tgg atg gcc acc tac 590
Glu Met Gln Val Leu Val Ser Arg Ile Ala Ser Trp Met Ala Thr Tyr
160 165 170
ctg aat gac cac cta gag cct tgg atc cag gag aac ggc ggc tgg gac 638
Leu Asn Asp His Leu Glu Pro Trp Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp Asp
10 175 180 185
act ttt gtg gat ctc tac ggg aac aat gca gca gcc gag agc cgg aaa 686
Thr Phe Val Asp Leu Tyr Gly Asn Asn Ala Ala Ala Glu Ser Arg Lys
190 195 200 205
ggc cag gag cgt ttc aac cgc tgg ttc ctg acg ggc atg act gtg gct 734
15 Gly Gln Glu Arg Phe Asn Arg Trp Phe Leu Thr Gly Met Thr Val Ala
210 215 220
ggg gta gtt ctg ctg ggc tca ctc ttc agt cgg aag tga ccagacactg 783
Gly Val Val Leu Leu Gly Ser Leu Phe Ser Arg Lys
225 230
20 accgtccact cacctctcac ctccacactt gccccacca caactctctc ttcagccacc 843
attgctacca ggagaaccac tacatgcaac tcaagcccct tccctatta tagggttggg 903
cctagacgga gtccctgca gttagcttgc tagaatctac cacgcttctg tgaaagccac 963
cttcccccca catctcagtt cccttggcct caaaactcac aaggtttttc ctcagatcag 1023
ctccttggag gctggcagga gtgggaaggg gtgtgctaga gggagaagag cctgccttgt 1083
25 tgggtgggacc ctgattaccc ctgagcctct cgggaatgct tttctggcag ggagctggag 1143
cccccccccc ccagagcca ttgagtgagg tgcttttagc ccttttgact aactaaaaat 1323



gcaggctgct tgggataacg aggcaaggac ctctcccca cctgtggcct ggccaagccc 1383
ccactcctgg tctgaatgtt ctctgaggc ctctggctag agtccagccc caccaggag 1443
gagggacgga gctgcggaaa gtccaccctg cgagagcctg agcggctctt gcggcttagc 1503
accaccccag atccttctcc acccctcccc tggctccatg gtgaccatga ctgagggacc 1563
5 aactgggccc acgctaggtg cccagagct gttaatgact tcagctgcct cacttcctgc 1623
aagatcagcc tgtggcatct ttgccttggg tgctggccac aggtccagg gactctggcc 1683
ttagcccaga agtgagagga agcttacagc gcagctatgg gagccctggg ggcttcct 1742

10 <210> 2

<211> 233

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

15 Met Ser Gln Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys

1 5 10 15

Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser Trp Ser Gln Phe Ser Asp Val Glu Glu

20 25 30

Asn Arg Thr Glu Ala Pro Glu Glu Thr Glu Pro Glu Arg Glu Thr Pro

20 35 40 45

Ser Ala Ile Asn Gly Asn Pro Ser Trp His Leu Ala Asp Ser Pro Ala

50 55 60

Val Asn Gly Ala Thr Gly His Ser Ser Ser Leu Asp Ala Arg Glu Val

65 70 75 80

25 Ile Pro Met Ala Ala Val Lys Gln Ala Leu Arg Glu Ala Gly Asp Glu



His Ile Thr Pro Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Phe Glu Gln Val Val Asn
115 120 125
Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe
130 135 140
5 Ser Phe Gly Gly Ala Leu Cys Val Glu Ser Val Asp Lys Glu Met Gln
145 150 155 160
Val Leu Val Ser Arg Ile Ala Ser Trp Met Ala Thr Tyr Leu Asn Asp
165 170 175
His Leu Glu Pro Trp Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp Asp Thr Phe Val
10 180 185 190
Asp Leu Tyr Gly Asn Asn Ala Ala Ala Glu Ser Arg Lys Gly Gln Glu
195 200 205
Arg Phe Asn Arg Trp Phe Leu Thr Gly Met Thr Val Ala Gly Val Val
210 215 220
15 Leu Leu Gly Ser Leu Phe Ser Arg Lys
225 230

<210> 3
<211> 233
20 <212> PRT
<213> Modified protein
<400> 3
Met Ser Gln Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys
1 5 10 15
25 Leu Ser Gln Lys Gly Phe Ser Trp Ser Asn Phe Ser Asp Val Glu Glu
35 40 45



Ser Ala Ile Asn Gly Asn Pro Ser Trp His Leu Ala Asp Ser Pro Ala
50 55 60
Val Asn Gly Ala Thr Gly His Ser Ser Ser Leu Asp Ala Arg Glu Val
65 70 75 80
5 Ile Pro Met Ala Ala Val Lys Gln Ala Leu Arg Glu Ala Gly Asp Glu
85 90 95
Phe Glu Leu Arg Tyr Arg Arg Ala Phe Ser Asp Leu Thr Ser Gln Leu
100 105 110
His Ile Thr Pro Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Phe Glu Gln Val Val Asn
10 115 120 125
Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe
130 135 140
Ser Phe Gly Gly Ala Leu Cys Val Glu Ser Val Asp Lys Glu Met Gln
145 150 155 160
15 Val Leu Val Ser Lys Ile Ala Ser Trp Met Ala Thr Tyr Leu Asn Asp
165 170 175
His Leu Glu Pro Trp Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp Asp Thr Phe Val
180 185 190
Asp Leu Tyr Gly Asn Asn Ala Ala Ala Glu Ser Arg Lys Gly Gln Glu
20 195 200 205
Arg Phe Asn Arg Trp Phe Leu Thr Gly Met Thr Val Ala Gly Val Val
210 215 220
Leu Leu Gly Ser Leu Phe Ser Arg Lys
225 230

25



<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial sequence: Synthesized oligonucleotide

5 <400> 4

nnnnnnnacta gtggatcctg gaagag

26

<210> 5

10 <211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial sequence: Synthesized oligonucleotide

15 <400> 5

gcaatctttac tcaccaatac ctgcatct

28

<210> 6

20 <211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial sequence: Synthesized oligonucleotide

25 <400> 6



<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

5 <220>

<223> Artificial sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 7

tcctggatcc aaggctcta

19

10

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

15 <220>

<223> Artificial sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 8

gctaaagtta ctccagctgt atcctttc

28

20

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

25 <220>

ctggagtaac tttagcgatg tcgaagagaa c

31



- <210> 10
<211> 26
<212> DNA
5 <213> Artificial sequence
<220>
<223> Artificial sequence: Synthesized oligonucleotide
<400> 10
ccagctgaat cctttctggg agagct 26
10
- <210> 11
<211> 27
<212> DNA
15 <213> Artificial sequence
<220>
<223> Artificial sequence: Synthesized oligonucleotide
<400> 11
aaaggattca gctggagtaa ctttagc 27
20
- <210> 12
<211> 11
<212> PRT
25 <213> HIV-1



<210> 13

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Drosophila

<400> 13

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Phe Lys

1

5

10

15

10

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

15 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial sequence: Synthesized oligonucleotide

<400> 14

cgtcgtcgtg gtatgtctca gagcaaccgg

30

20

<210> 15

<211> 34

<212> DNA

25 <213> Artificial sequence

<400> 15



nnnnaagctt catcacttcc gactgaagag tgag

34

<210> 16

5 <211> 57

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial sequence: Synthesized oligonucleotide

10 <400> 16

catatggggtt atggtcgcaa aaaacgccgt cagcgtcgtc gtggtatgtc tcagagc 57

<210> 17

15 <211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial sequence: Synthesized oligonucleotide

20 <400> 17

nnnnnnnnca tatgggttat ggtcgc

26



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05502

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C12N 5/06, C07K 14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C12N 5/06, C07K 14/47

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
MEDLINE (STN), EMBL/DDBJ/Genbank/PIR/SwissProt/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. Biol. Chem., Vol. 272[44] (1997) M. Aritomi et al., "Crystal Structure of Rat Bcl-x _L ", pp.27886-27892	1-8
A	J. Immunol., Vol.153[10] (1994) W. Fang et al., "Cloning and Molecular Characterization of Mouse bcl-x in B and T Lymphocytes", pp.4388-4394	1-8
A	J. Immunol., Vol.158[10] (1994) D.A.M. Grillot et al., Genomic Organization, Promoter Region Analysis, and Chromosome Localization of the Mouse bcl-x Gene", pp.4750-4757	1-8
A	J. Biol. Chem., Vol.271[22] (1996) N. Shirakawa et al., "An Additional Form of Rat Bcl-x, Bcl-x β , Generated by an Unspliced RNA, Promotes Apoptosis in Promyeloid Cells", pp.13258-13265	1-8
A	Endocrinology, Vol. 136[1] (1995) J. L. Tilly et al., "Expression of Members of the Bcl-2 Gene Family in the Immature Rat Ovary : Equine Chorionic Gonatropin- Mediated Inhibition of Granulosa Cell Apoptosis Is	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not
 considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing
 date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
 cited to establish the publication date of another citation or other
 special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other

"T" later document published after the international filing date or
 priority date and not in conflict with the application but cited to
 understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered novel or cannot be considered to involve an inventive
 step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered to involve an inventive step when the document is
 combined with one or more other such documents, such

Date of the actual completion of the international search
18 October, 2000 (18.10.00)Date of the actual completion of the international search
18 October, 2000 (18.10.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05502

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Associated with Decreased Bax and Constitutive Bcl-2 and Bcl-x _{long} Messenger Ribonucleic Acid Levels", pp.232-241 Development, Vol.120[10] (1994) M. Gonzalez-Garcia et al., "bcl-x _L is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria", pp.3033-3042	1-8

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/05502

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 15/12, C12N 5/06, C07K 14/47

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 15/12, C12N 5/06, C07K 14/47

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG),
MEDLINE (STN), EMBL/DDBJ/Genbank/PIR/SwissProt/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J. Biol. Chem., Vol. 272[44] (1997) M. Aritomi et al. "Crystal Structure of Rat Bcl-x _L " p. 27886-27892	1-8
A	J. Immunol., Vol. 153[10] (1994) W. Fang et al. "Cloning and Molecular Characterization of Mouse bcl-x in B and T Lymphocytes" p. 4388-4394	1-8
A	J. Immunol., Vol. 158[10] (1994) D. A. M. Grillo et al. "Genomic Organization, Promoter Region Analysis, and Chromosome Localization of the Mouse bcl-x Gene" p. 4750-4757	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JJP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇



4B 9453

電話番号 03-3581-1101 内線 2418

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J. Biol. Chem., Vol. 271[22] (1996) N. Shirakawa et al. "An Additional Form of Rat Bcl-x, Bcl-x β , Generated by an Unspliced RNA, Promotes Apoptosis in Promyeloid Cells" p. 13258-13265	1-8
A	Endocrinology, Vol. 136[1] (1995) J. L. Tilly et al. "Expression of Members of the Bcl-2 Gene Family in the Immature Rat Ovary: Equine Chorionic Gonadotropin-Mediated Inhibition of Granulosa Cell Apoptosis Is Associated with Decreased Bax and Constitutive Bcl-2 and Bcl-x _{long} Messenger Ribonucleic Acid Levels" p. 232-241	1-8
A	Development, Vol. 120[10] (1994) M. Gonzalez-Garcia et al. "bcl-x _L is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria" p. 3033-3042	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05502

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C12N 5/06, C07K 14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C12N 5/06, C07K 14/47

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
MEDLINE (STN), EMBL/DBJ/Genbank/PIR/SwissProt/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. Biol. Chem., Vol. 272[44] (1997) M. Aritomi et al., "Crystal Structure of Rat Bcl-x _L ", pp.27886-27892	1-8
A	J. Immunol., Vol.153[10] (1994) W. Fang et al., "Cloning and Molecular Characterization of Mouse bcl-x in B and T Lymphocytes", pp.4388-4394	1-8
A	J. Immunol., Vol.158[10] (1994) D.A.M. Grillot et al., Genomic Organization, Promoter Region Analysis, and Chromosome Localization of the Mouse bcl-x Gene", pp.4750-4757	1-8
A	J. Biol. Chem., Vol.271[22] (1996) N. Shirakawa et al., "An Additional Form of Rat Bcl-x, Bcl-x β , Generated by an Unspliced RNA, Promotes Apoptosis in Promyeloid Cells", pp.13258-13265	1-8
A	Endocrinology, Vol. 136[1] (1995) J. L. Tilly et al., "Expression of Members of the Bcl-2 Gene Family in the Immature Rat Ovary : Equine Chorionic Gonatropin- Mediated Inhibition of Granulosa Cell Apoptosis Is	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance"E" earlier document but published on or after the international filing
date"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other

information

concerning the invention

as the priority date of the invention

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such

as a document of the prior art known to a person skilled in the art

Date of the actual completion of the international search:

18 October, 2000 (18.10.00)

Date of mailing of the international search report:

31 October, 2000 (31.10.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05502

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>Associated with Decreased Bax and Constitutive Bcl-2 and Bcl-x_{long} Messenger Ribonucleic Acid Levels", pp.232-241</p> <p>Development, Vol.120[10] (1994) M. Gonzalez-Garcia et al., "bcl-x_L is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria", pp.3033-3042</p>	1-8



ST
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 00-F-034PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA 416)	
International application No PCT/JP00/05502	International filing date (<i>day month year</i>) 17 August 2000 (17.08.00)	Priority date (<i>day month year</i>) 17 August 1999 (17.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12, 5/06, C07K 14/47		
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT)</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of publication of the International Preliminary Examination Report	Date of receipt of the International Preliminary Examination Report
Signature of the International Preliminary Examining Authority	Signature of the Applicant



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No

PCT/JP00/05502

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 page _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, figures _____

* The elements of the international application which are not mentioned in the report are those which do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/05502

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability:
citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: J. Biol. Chem., Vol. 272, No. 44, 1997, pp. 27886-27892

Document 2: J. Immunol., Vol. 153, No. 10, 1994, pp. 4388-4394

Document 3: J. Immunol., Vol. 158, No. 10, 1994, pp. 4750-4757

Document 4: J. Biol. Chem., Vol. 271, No. 22, 1996, pp. 13258-13265

Document 5: Endocrinology, Vol. 136, No. 1, 1995, pp. 232-241

Document 6: Development, Vol. 120, No. 10, 1994, pp. 3033-3042

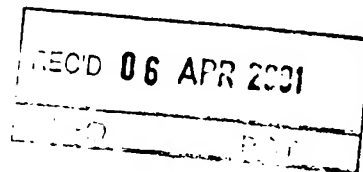
The inventions set forth in Claims 1-8 appear to involve an inventive step with respect to documents 1-6 cited in the international search report. Documents 1-6 do not describe base substitutions at Position Nos. 22, 26, or 165 of the coding region to replace the original amino acid with a specified amino acid, and persons skilled in the art cannot easily conceive of these matters from the descriptions in documents 1-6.



PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]



出願人又は代理人 の書類記号 00-F-034PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/05502	国際出願日 (日.月.年) 17.08.00	優先日 (日.月.年) 17.08.99
国際特許分類 (IPC) Int.Cl ¹ C12N15/12, C12N5/06, C07K14/47		
出願人 (氏名又は名称) 科学技術振興事業団		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 09.02.01	国際予備審査報告を作成した日 19.03.01
------------------------------	----------------------------

〒100-8581 東京都千代田区有明1-1-1 日本郵政

電話番号 03-3581-1101 内線 3448





I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ、図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ、図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ、図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-8 有
請求の範囲 無

進歩性(IS)

請求の範囲 1-8 有
請求の範囲 無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲 1-8 有
請求の範囲 無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: J. Biol. Chem. (1997), Vol. 272, No. 44, p. 27886-27892

文献2: J. Immunol. (1994), Vol. 153, No. 10, p. 4388-4394

文献3: J. Immunol. (1994), Vol. 158, No. 10, p. 4750-4757

文献4: J. Biol. Chem. (1996), Vol. 271, No. 22, p. 13258-13265

文献5: Endocrinology (1995), Vol. 136, No. 1, p. 232-241

文献6: Development (1994), Vol. 120, No. 10, p. 3033-3042

請求の範囲1~8に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1~6に対して進歩性を有する。文献1~6にはコード領域の22, 26または165番目のいずれかの塩基を特定のものに置換することが記載されておらず、しかもその点は文献1~6から当業者といえども容易に想到し得ないものである。



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号	00-F- 034PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/05502	国際出願日 (日.月.年) 17.08.00	優先日 (日.月.年) 17.08.99	
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☐ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☐ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこ

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 15/12, C12N 5/06, C07K 14/47

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 15/12, C12N 5/06, C07K 14/47

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
MEDLINE (STN), EMBL/DDBJ/Genbank/PIR/SwissProt/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J. Biol. Chem., Vol. 272[44] (1997) M. Aritomi et al. "Crystal Structure of Rat Bcl-x _L " p. 27886-27892	1-8
A	J. Immunol., Vol. 153[10] (1994) W. Fang et al. "Cloning and Molecular Characterization of Mouse bcl-x in B and T Lymphocytes" p. 4388-4394	1-8
A	J. Immunol., Vol. 158[10] (1994) D. A. M. Grillot et al. "Genomic Organization, Promoter Region Analysis, and Chromosome Localization of the Mouse bcl-x Gene" p. 4750-4757	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関 1-2-2

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

電話番号 03-3588-1101 (内線 2449)





C (続き) .. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J. Biol. Chem., Vol. 271[22] (1996) N. Shirakawa et al. "An Additional Form of Rat Bcl-x, Bcl-x β , Generated by an Unspliced RNA, Promotes Apoptosis in Promyeloid Cells" p. 13258-13265	1 - 8
A	Endocrinology, Vol. 136[1] (1995) J. L. Tilly et al. "Expression of Members of the Bcl-2 Gene Family in the Immature Rat Ovary: Equine Chorionic Gonadotropin-Mediated Inhibition of Granulosa Cell Apoptosis Is Associated with Decreased Bax and Constitutive Bcl-2 and Bcl-x _{long} Messenger Ribonucleic Acid Levels" p. 232-241	1 - 8
A	Development, Vol. 120[10] (1994) M. Gonzalez-Garcia et al. "bcl-x _L is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria" p. 3033-3042	1 - 8

